

**Ein kombinatorischer Ansatz zur Entwicklung von
spezifischen Löslichkeitsvermittlern für niedermolekulare
Wirkstoffe**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

M.Sc. Sebastian Wieczorek

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hans G. Börner

2. Prof. Dr. Christian P. R. Hackenberger

3. Prof. Dr. Tanja Weil

Tag der mündlichen Prüfung: 27. April 2016

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hans G. Börner am Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin in der Zeit von Februar 2011 bis Februar 2015 angefertigt.

Abstract

Insufficient water solubility of small molecule compounds is one of the major issues in pharmaceutical drug development causing tremendous costs due to failure of numerous high potential lead structures. Herein, a generic method to develop specific solubilizers for insoluble, small molecules is presented. Suitable binding partners for a set of sensitizers for photodynamic cancer therapy (m-THPC, Pheophorbide A und Chlorin E6) were selected from a split&mix peptide library. The enrichment of sensitizer molecules at high affinity peptide sequences was followed by monitoring their intrinsic fluorescence via fluorescence microscopy. Positive hits were isolated and amino acid sequences were identified by tandem mass spectrometry (MALDI-Tof-MS/MS). The information gained about the requirement for non-covalent binding on a molecular level was used to synthesize specific solubilizers for small molecule drug entities. Therefore, identified peptide sequences were conjugated to a polyethylene oxide block to obtain water solubility, whereas peptide segments provide non-covalent binding of drug molecules. Insoluble photosensitizers were successfully rendered water soluble by peptide-PEO conjugates. Key parameters like drug payload capacity, aggregation behavior and guest molecule release, as well as activity regarding singlet oxygen generation, were studied. By adaptation and variation of screening conditions, conjugate architecture and incorporation of a switchable building block, properties of conjugate solubilizers were fine-tuned further. To evaluate screening sensitivity towards structural aspects of screened small molecules and specify of resulting solubilizers, screening results of different sensitizers and peptide-PEO solubilizers performance were compared. Finally, cellular uptake of solubilized photosensitizer in cancer cells and uptake pathways was studied in vitro using confocal laser-scanning microscopy and fluorescence lifetime imaging.

Keywords: Drug delivery, drug formulation, PEG, peptide, bioconjugates, combinatorial screening, precision polymers

Kurzzusammenfassung

Die mangelnde Wasserlöslichkeit von Wirkstoffen ist eines der größten Probleme in der pharmazeutischen Medikamentenentwicklung, welches durch das Scheitern zahlloser vielversprechender Leitstrukturen immense Kosten verursacht. Es wird eine Methode vorgestellt, um spezifische Löslichkeitsvermittler für schwerlösliche, niedermolekulare Verbindungen zu entwickeln. Dafür wurden Partner für die nichtkovalente Bindung von Wirkstoffen aus Peptidbibliotheken identifiziert. Als Testsubstanzen wurden Sensibilisatoren für die photodynamische Krebstherapie gewählt. Über die Fluoreszenz der Photosensibilisatoren konnte die Anreicherung an Polymerpartikeln verfolgt werden, deren Peptidsequenzen eine hohe Affinität zu den Wirkstoffen besaßen. Positive Treffer wurden isoliert und deren Aminosäuresequenz mittels Tandem-Massenspektrometrie bestimmt. Diese Informationen wurden verwendet, um Löslichkeitsvermittler für die Sensibilisatoren zu synthetisieren. Dafür wurden die Sequenzen an einen hydrophilen Polyethylenoxid-Block (PEO) konjugiert, wobei das Peptidsegment die Bindung des Gastmoleküls vermittelt, während der Polymerblock die Wasserlöslichkeit des Komplexes garantiert. Mit diesen Konjugaten wurden die Sensibilisatoren erfolgreich in wässrige Lösung gebracht. Die Eigenschaften der Solubilisatoren bezüglich Beladungsgrad, Aggregation und Freisetzung der Gastmoleküle wurde untersucht, sowie die Aktivität der solubilisierten Sensibilisatoren bezüglich der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff. Die Anpassung der Screening-Bedingungen, der Konjugat-Architektur und den Einbau eines schaltbaren Bausteins erlaubte die zusätzlich Feinjustierung. Durch einen Vergleich der verschiedenen Sensibilisatoren wurde die Sensibilität der Methode für strukturelle Unterschiede der Testsubstanzen und die Spezifität der gewonnenen Solubilisatoren für ihr Zielmolekül überprüft. Zuletzt wurden die Aufnahme und der Aufnahmemechanismus der solubilisierten Sensibilisatoren in Krebszellen studiert.

Schlagwörter: Arzneistoffabgabe, Medikamentenformulierung, PEG, Peptid, Biokonjugate, Kombinatorische Selektion, Präzisionspolymere

Inhaltsverzeichnis

1.	Motivation und Zielstellung	8
2.	Einführung und Grundlagen	10
2.1.	Pharmazeutische Medikamentenentwicklung	10
2.1.1.	Hochdurchsatz-Screening	12
2.1.2.	Kombinatorische Chemie	13
2.1.3.	Probleme der modernen Wirkstoffentwicklung	15
2.2.	Medikamententransporter	16
2.2.1.	Polymere Wirkstofftransporter	18
2.2.2.	Polyethylenoxid (PEO)	21
2.2.3.	Peptid-Polymer-Konjugate	23
2.2.4.	Targeting bei <i>Drug-Delivery</i> -Systemen	30
2.3.	Photodynamische Therapie	32
2.3.1.	Mechanismus der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff	35
2.3.2.	Photosensibilisatoren	37
2.3.3.	Temoporfin (Foscan®)	39
3.	Ergebnisse	41
3.1.	Entwicklung des <i>Screening</i> -Verfahrens	41
3.1.1.	Konzept des <i>Screening</i> -Verfahrens	42
3.1.2.	Design der Peptidbibliothek	45
3.2.	<i>Screening</i> von <i>m</i> -THPC gegen die Peptidbibliothek	49
3.2.1.	Identifikation von positiven Treffern	49
3.2.2.	Sequenzierung der Treffer mittels MALDI-ToF-MS/MS	50
3.2.3.	Synthese von Peptid-PEO-Konjugaten	53
3.3.	Solubilisierung von <i>m</i> -THPC	54
3.3.1.	Beladung der Konjugate	54
3.3.2.	Bindungsstudien von <i>m</i> -THPC und Peptid-PEO-Konjugaten	56
3.3.3.	Strukturaufklärung mittels dynamischer Lichtstreuung	59
3.3.4.	Freisetzung von <i>m</i> -THPC	61
3.3.5.	Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch <i>m</i> -THPC	67
3.3.6.	<i>Screening</i> für geeignete Bindungspartner in organischen Lösemitteln	69

3.4.	Konjugat-Architekturen.....	73
3.4.1.	Einfluss einer veränderten PEO-Block-Länge auf die Solubilisatoren.....	73
3.4.2.	Einfluss einer veränderten Architektur des Peptidsegments.....	76
3.4.3.	Erweiterung der Konjugate um einem hydrophoben Block.....	81
3.5.	Schaltbare Solubilisatoren.....	85
3.5.1.	Design der Peptidbibliothek.....	86
3.5.2.	<i>Screening</i> und Sequenzierung.....	88
3.5.3.	Solubilisierung von <i>m</i> -THPC mit spaltbaren Transportern	90
3.5.4.	Bindungsstudien zwischen <i>m</i> -THPC und spaltbaren Transportern	92
3.5.5.	Aggregatbildung zwischen <i>m</i> -THPC und spaltbaren Transportern	94
3.5.6.	Freisetzung von <i>m</i> -THPC unter Spaltung der Transporter	95
3.6.	Vergleich verschiedener Photosensibilisatoren im <i>Screening</i>	99
3.7.	Aufnahme und Freisetzung der Wirkstoffe in Krebszellen.....	109
3.7.1.	Verfolgung der zellulären Aufnahme der Photosensibilisatoren <i>in vitro</i>	110
3.7.2.	Fluoreszenzmarkierung von Peptid-PEO-Konjugaten.....	113
3.7.3.	Fluoreszenzlebenszeit-Mikroskopie von <i>m</i> -THPC in <i>Jurkat</i> -Zellen	117
4.	Zusammenfassung	120
5.	Ausblick.....	121
6.	Experimenteller Teil	123
6.1.	Chemikalien und Lösemittel.....	123
6.2.	Synthese der <i>Split&Mix</i> -Peptidbibliotheken.....	124
6.3.	Screening der Peptidbibliotheken.....	126
6.4.	Isolierung von positiven Treffern und Abspaltung vom Harz.....	127
6.5.	Sequenzierung mittels MALDI-ToF-MS/MS-Spektrometrie.....	127
6.6.	Synthese von Peptid-PEO-Konjugaten.....	128
6.7.	Charakterisierung der Peptid-PEO-Konjugate	130
6.8.	Bindungs-Studien / Modellierung.....	130
6.9.	Solubilisierung von <i>m</i> -THPC, Chlorin E6 und Pheophorbid A	134
6.10.	Fluoreszenzspektroskopie	137
6.11.	Hochdruck-Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS)	144
6.12.	Dynamische Lichtstreuung	146

6.13.	Erzeugung von Singulett-Sauerstoff.....	147
6.14.	Zellkultur	148
6.15.	Inkubation der <i>Jurkat</i> -Zellen	149
6.16.	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	150
6.17.	Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM).....	152
7.	Appendix	153
7.1.	Fluoreszenzmikroskopie.....	153
7.2.	Identifizierte Peptidsequenzen	158
7.3.	Produktcharakterisierung	167
8.	Referenzen.....	200
9.	Abkürzungsverzeichnis	218
10.	Danksagung	222

1. Motivation und Zielstellung

Bei rund 90 % der auf dem Markt befindlichen Medikamente zählen die enthaltenen pharmazeutisch aktiven Substanzen zur Klasse der niedermolekularen Wirkstoffe.^[5] Wasserunlöslichkeit von niedermolekularen Wirkstoffen und die daraus resultierenden Effekte auf deren Anwendbarkeit, Wirksamkeit und Zulassung ist eines der größten Probleme der pharmazeutischen Medikamentenentwicklung. Die etablierten Formulierungsadditive oder *Drug-Delivery*-Systeme (DDS) für die Solubilisierung und den Transport der pharmakologisch aktiven Substanzen gehen aber selten über die unspezifische Bindung des Gastmoleküls in Reservoir- und Matrixsystemen hinaus. Hingegen sind die Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen wie Proteinen mit kleinen Gastmolekülen äußerst komplex und spezifisch. Daher bietet es sich an, dass Forscher sich von den Konzepten der Natur inspirieren lassen, um neue Generationen an spezifischen Wirkstofftransportern zu entwickeln. Für synthetische Makromoleküle wie Polymere lässt sich allerdings die vollständige Kontrolle über die Monomersequenz und die daraus resultierende Komplexität von Faltung in höheren Strukturen, welche häufig für die Funktion des Moleküls notwendig ist, bisher nicht erreichen. Ein Ansatzpunkt für bioinspirierte, funktionale Systeme ist die Konjugation von kleinen, monodispersen und sequenzkontrollierten Segmenten wie Peptiden an ein synthetisches Polymer. Ziel ist es, die Eigenschaften eines großen Biopolymers nachzuahmen, indem versucht wird, die gewünschte Funktion z.B. eines Proteins in diese kleinen Segmente zu programmieren, während das Grundgerüst ein synthetisches Polymer darstellt. Somit werden die Vorteile beider Stoffklassen sinnvoll miteinander kombiniert und eine ganz neue Bandbreite an funktionellen Materialien erschlossen.

Ziel dieser Arbeit war es, eine grundlegende Methode zu entwickeln, mit welcher monodisperse (Bio-)Polymere für die nichtkovalente Bindung von niedermolekularen Verbindungen identifiziert werden können, um spezifische Löslichkeitsvermittler für wasserunlösliche Wirkstoffe zu entwickeln. Als Biopolymere mit definierter Monomersequenz sollten in diesem Fall Peptide dienen. Um eine möglichst große Anzahl an verschiedenen funktionellen Gruppen in diversen Kombinationen und Reihenfolgen als potentielle Bindungspartner zur Verfügung zu haben, sollte zunächst eine Peptidbibliothek erstellt werden. Durch das Testen der niedermolekularen Wirkstoffe (engl. *Screening*) gegen

die Bibliothek sollte eine optimale Kombination an Funktionalitäten in der Monomersequenz des Peptids identifiziert werden, um eine spezifische Bindung zwischen Peptid und Wirkstoff zu erreichen.

Mit den aus dem *Screening* gewonnenen Informationen bezüglich geeigneter Sequenzen sollten Peptid-Polyethylenoxid-Konjugate synthetisiert werden, welche anschließend als spezifische Löslichkeitsvermittler für die unlöslichen, niedermolekularen Verbindungen dienten. Dabei vermittelte das Peptidsegment die spezifische, nichtkovalente Bindung zu einem Gastmolekül, während der hydrophile Polyethylenoxid-Block (PEO) dem System die nötige Wasserlöslichkeit verlieh. Als erste Testverbindung für diesen Ansatz wurde der Photosensibilisator 5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)chlorin (*m*-THPC, Foscan[®]), welcher in der photodynamischen Therapie (PDT) eingesetzt wird, gewählt. Dieser besitzt ein ausgesprochen hohes Potential für die photodynamische Krebstherapie, wie bereits in zahlreichen Studien bewiesen wurde, allerdings gestaltet sich dessen uneingeschränkte Zulassung und die breite Anwendung, bedingt durch die schlechte Wasserlöslichkeit des Wirkstoffs, weiterhin schwierig.^[1,6-8]

Für die Herstellung der Peptidbibliothek, welche für das *Screening* nach geeigneten Bindungspartnern für *m*-THPC notwendig war, wurde die kombinatorische Methode der *Split&Mix*-Synthese ausgewählt. Damit ließ sich mit verhältnismäßig einfachen Mitteln der Festphasenpeptidsynthese ein möglichst großer Sequenzraum an Aminosäurekombinationen abdecken. Das *Screening* der Peptide selbst fand dabei ebenfalls noch an der festen Phase statt, so dass positive Treffer problemlos aus der Bibliothek isoliert werden konnten. Die tatsächlichen Monomersequenzen der identifizierten Bindungspartner für den Wirkstoff sollten nach Abspaltung des Peptidmaterials vom festen Trägermaterial durch moderne Mittel der Proteomik (MALDI-ToF-MS/MS und Datenbanksuche) aufgeklärt werden. Außerdem galt es, die neuen Transportsysteme mit diversen Methoden auf ihre Eigenschaften und Eignung als Transporter für den Wirkstoff zu untersuchen.

2. Einführung und Grundlagen

2.1. Pharmazeutische Medikamentenentwicklung

Die Aufklärung des menschlichen Genoms und Fortschritte in der Proteomik sowie in der Strukturaufklärung und Simulation von Biomolekülen haben Forschern in den letzten Jahrzehnten nie dagewesene Möglichkeiten eröffnet, Krankheiten auf molekularer Ebene zu verstehen und gezielt zu therapieren.^[9-12] Damit war es der Pharmaindustrie möglich, immer potentere und spezifischere Medikamente sowie Therapien für bisher unheilbare Krankheiten zu entwickeln. Die Kehrseite dieses Fortschritts war aber zweifelsohne, dass mit zunehmender Komplexität der Krankheiten und Therapieformen auch die Entwicklungskosten für ein neues, marktreifes Medikament immens anstiegen.^[13,14] Erschwerend kommt hinzu, dass ein Großteil der verhältnismäßig leicht zu therapierenden Krankheitsformen bereits abgedeckt und im Regelfall die existierenden Wirkstoffe durch Patente abgesichert sind. Damit sehen sich moderne Pharmaunternehmen dem Problem konfrontiert, dass die Entwicklung neuer Wirkstoffe zu einem marktreifen Medikament immense Kosten verursachen und Jahrzehnte dauern kann. Auch nehmen die Kosten für die behördliche Überprüfung und Zulassung zu, da immer strengere Auflagen in Sachen Medikamentensicherheit und -effektivität, sowie bezüglich des Umweltschutzes, erfüllt werden müssen. Ebenso erhöht das politische Bestreben, die Ausgaben im Gesundheitswesen zu senken, indem z.B. vornehmlich Generika von ausgelaufenen Patenten verschrieben werden müssen, den Druck auf Unternehmen, die sich eine teure Forschung und Entwicklung leisten.

Ein Indikator für diesen Trend ist, dass die Anzahl an von der US-amerikanischen Behörde für Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassung (engl.: *Food and Drug Administration*, FDA) neu zugelassenen Medikamenten mit 19 Präparaten im Jahre 2007 auf den niedrigsten Stand seit 1983 zurückgegangen ist.^[13] Im Jahr 2009 waren es immerhin 24, wovon allerdings nur 17% als wirklich neuartige Wirkstoffe angesehen werden können. Die Summe der Ausgaben für Forschung und Entwicklung der großen Pharmaunternehmen im Verhältnis zu der Anzahl an neu zugelassenen Präparaten ergibt Kosten für die Entwicklung und Zulassung eines neuen Medikaments von durchschnittlich rund 2.6 Mrd. US-Dollar.^[15,16] Die Rentabilität von Forschung und Entwicklung lässt damit seit Jahren nach^[17] und in

manchen Szenarien wird bereits der Niedergang der Pharmaindustrie prognostiziert.^[18] Mit der zurückgehenden Wirtschaftlichkeit von Forschung und Entwicklung werden aber Chancen für neue und innovative Medikamente vertan. Gegebenenfalls können dann aufkommende Volkskrankheiten (z.B. Diabetes) ohne neuartige Medikamente nicht hinreichend therapiert werden. Schließlich werden rund 40% der zwischen 1986 und 2000 um zwei Jahre gestiegenen Lebenserwartung der Entwicklung neuer Medikamente zugesprochen.^[19]

Somit müssen ständig neue Ansätze verfolgt werden, um die Produktivität und Wirtschaftlichkeit von Forschung und Entwicklung zu steigern, wenn die Konkurrenzfähigkeit des eigenen Unternehmens gesichert werden soll. Die Pharmaforschung kann prinzipiell in mehrere Stufen unterteilt werden, wobei sie grundlegend aus der Phase der Wirkstoffentdeckung, der präklinischen Entwicklung und den klinischen Phasen besteht (**Abbildung 1**). Bei den Entwicklungskosten eines vollständig neuen Wirkstoffes (engl.: *New Molecular Entity*, NME) machen die klinischen Studien (Phase I - III) ca. 63%, sowie die vorklinische Wirkstoffentdeckung und -entwicklung ca. 32% der Kosten aus.^[13] Von den ausgewählten Kandidaten für die Weiterentwicklung schaffen es nur ein Bruchteil zur Markteinführung und es dauert im Schnitt 13.5 Jahre von der Entdeckung bis zur Zulassung eines neuen Medikaments. Aus den vorklinischen Phasen der Wirkstoffentwicklung ist die Optimierung der Leitstrukturen die kostenintensivste Phase (ca. 17 % der Gesamtkosten).

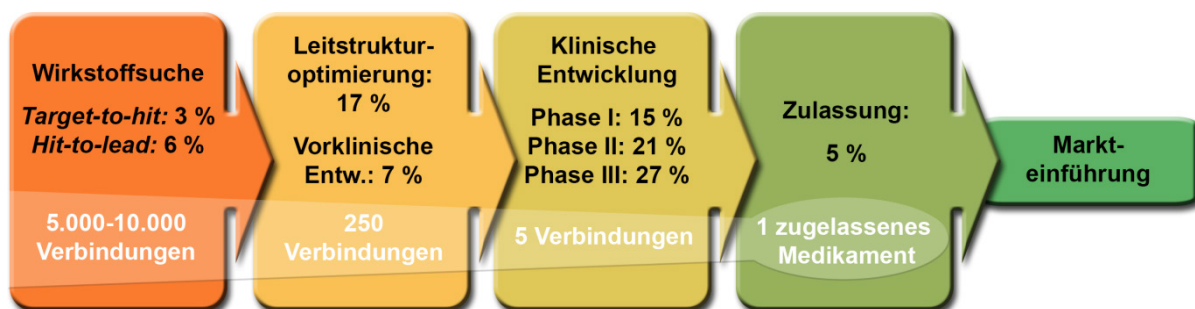


Abbildung 1. Stufen der pharmazeutischen Wirkstoffentdeckung und -entwicklung mit den prozentualen Kostenanteilen, die durch sie entstehen, sowie die Anzahl an unterschiedlichen Verbindungen, die im Schnitt in jeder Stufe getestet und entwickelt werden müssen, um ein marktreifes Medikament zu erreichen.^[13-15]

2.1.1. Hochdurchsatz-Screening

Um die Produktivität und Wirtschaftlichkeit in der Pharmaforschung maßgeblich zu steigern, wurden Methoden wie die des Hochdurchsatz-Screenings (engl.: *High Throughput Screening*, HTS) entwickelt. Mit ihr können automatisiert Millionen von Substanzen einer Molekülbibliothek getestet werden, um neue, pharmakologisch aktive Verbindungen zu identifizieren, welche anschließend zu Leitstrukturen weiterentwickelt werden können. Derzeit ist es die am weitesten verbreitete Technologie, um Ansatzpunkte für die Wirkstoffentdeckung und -entwicklung zu liefern. Dabei werden hauptsächlich *Target*-basierte Tests (*Assays*) durchgeführt, bei denen eine Bibliothek an niedermolekularen Wirkstoffen gegen ein bestimmtes Zielmolekül getestet wird. Ziele können Biomoleküle wie Enzyme, Rezeptoren oder Ionenkanäle sein, deren Aktivität mit den niedermolekularen Verbindungen moduliert werden soll.^[20] Die Substanzbibliotheken, Testverfahren und Zielmoleküle variieren, je nachdem auf welche Krankheiten sich das entsprechende Pharmaunternehmen fokussiert. G-Protein gekoppelte Rezeptoren (engl.: *G-Proteine-Coupled Receptors*, GPCRs) sind dabei bisher die am meisten untersuchten Ziele, da bereits über 600 Gene des menschlichen Genoms entschlüsselt wurden, welche für GPCRs kodieren.^[21] Sie stellen verhältnismäßig gute Ziele für die Modulation mittels niedermolekularer Wirkstoffe dar, da sie meist auch im Organismus über natürliche, niedermolekulare Liganden reguliert werden.

Um Kosten zu sparen und das aufwendige HTS zu beschleunigen, wird ein enormer technischer Aufwand für die Automatisierung der Labore betrieben und es kommen Pipettierroboter, Lesegeräte für Mikrotiterplatten, automatisierte Zellkulturen und Mikroskope zum Einsatz. Es werden Mikrotiterplatten mit bis zu 3456 einzelnen Reaktionsgefäßen verwendet, um viele Moleküle gleichzeitig testen zu können. Es existiert eine Vielzahl an *Assays* für biochemische, genetische und pharmakologische Fragestellungen. Sie können dabei auf isolierte Zielmoleküle, zellfreie Multikomponentensysteme, sowie Zell- oder Organismus-basierte Systeme (z.B. Fischembryonen) zurückgreifen.^[22] Auch die Molekülbibliotheken selbst können aus verschiedenen Substanzklassen, wie Peptide, Naturprodukte oder bekannte Wirkstoffe, bestehen. Die meisten Bibliotheken werden allerdings mit Mitteln der kombinatorischen Chemie hergestellt, um mit möglichst geringem Aufwand eine Vielzahl an verschiedenen Verbindungen herzustellen. Die Syntheseverfahren

dafür können mittlerweile auch automatisiert werden und das Design der Bibliothek wird häufig computergestützt durchgeführt, um sie im Voraus auf das Ziel zuzuschneiden (engl.: *directed library*).^[23-26] HTS und kombinatorische Chemie werden mittlerweile nicht nur in der Pharmaforschung eingesetzt, sondern z.B. auch in der Materialforschung und für die Entdeckung neuer Katalysatoren.^[27]

2.1.2. Kombinatorische Chemie

Die gängigste Methode, um synthetische Substanzbibliotheken mit einer Vielzahl an verschiedenen Verbindungen für das Hochdurchsatz-*Screening* zu generieren, ist die kombinatorische Chemie. Im Vergleich zu der traditionellen Herangehensweise, eine einzige, wohldefinierte Struktur zu synthetisieren, können hier mehrere Bausteine jeweils miteinander kombiniert werden, um eine exponentiell ansteigende Zahl an verschiedenen Molekülen zu generieren (**Abbildung 2**). Zum Beispiel werden ausgehend von einer Grundstruktur systematisch verschiedene Derivate hergestellt, indem an das Grundgerüst unterschiedliche chemische Gruppen gekuppelt werden. Die Reaktionen können parallel in getrennten Reaktionsgefäßen durchgeführt werden, um Einzelverbindungen zu erhalten, oder simultan in einem Gefäß für eine Mischung an Substanzen.

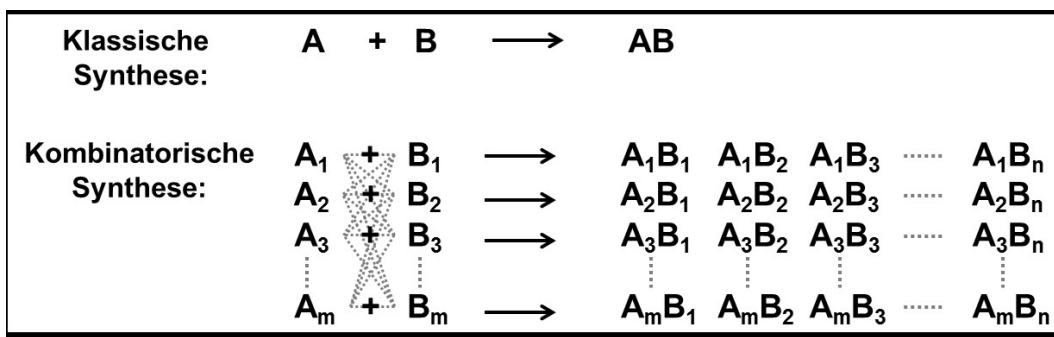


Abbildung 2. Vergleich der klassischen Synthese einer Verbindung (oben) mit der Strategie der kombinatorischen Chemie (unten), bei der verschiedene Bausteine miteinander kombiniert werden, um eine Matrix aus einer Vielzahl an Molekülen zu generieren.

Die Synthese von Substanzbibliotheken mittels kombinatorischer Chemie kann sowohl in Lösung, als auch an einer festen Phase durchgeführt werden.^[28-31] Die weiter verbreitete Technik ist die Festphasensynthese (engl.: *Solid Phase Synthesis*, SPS), bei der ein Trägermaterial, wie z.B. ein Polymerharz verwendet wird, an dessen funktionellen Gruppen die verschiedenen Reaktionen der Syntheseroute durchgeführt werden. Eine feste Phase hat

dabei den Vorteil, dass Reaktions- und Waschlösungen durch einfaches Abfiltrieren des festen Trägers schnell entfernt bzw. ausgetauscht werden können, wodurch keine weitere Aufreinigung des Produktes nach jedem Syntheszyklus nötig ist. Außerdem können hohe Ausbeuten durch die Verwendung eines großen Überschusses an Reagenzien erreicht werden und es bietet sich die Möglichkeit der Automatisierung.

Eine Vielzahl organischer Reaktionen wurde an der festen Phase etabliert, um die Möglichkeiten der kombinatorischen Chemie zu erweitern.^[32-35] Beispiele sind neben der Knüpfung von Amid-Bindungen^[36-38] in Form von Sulfonamid-, Harnstoff- und Lactam-Derivaten z.B. auch aromatische Substitutionen,^[39,40] Kondensationen,^[41] Cycloadditionen,^[42,43] Grignard,^[43] Michael-Addition^[44,45] oder enzymatische Reaktionen.^[46,47] Ebenso ist die Festphasensynthese von Peptiden, DNA und RNA heutzutage gängige Praxis, zu welcher Merrifield *et al.* Pionierarbeit leistete.^[48] Eine Methode, welche die Vorteile der Festphasensynthese von Peptiden mit dem Ansatz der kombinatorischen Chemie vereint, ist die in dieser Arbeit ebenfalls verwendete *Split&Mix*-Synthese von Peptidbibliotheken (vgl. Kapitel 3.1.2).^[49]

Für die Festphasensynthese wurden verschiedene feste Trägermaterialien, diverse Linker-Moleküle für die Verknüpfung und spätere selektive Abspaltung der Produkte vom Träger, sowie Schutzgruppenkonzepte für die nebenreaktionsfreie Synthese entwickelt. Die meisten Polymerharze für die SPS bestehen aus Polystyrol, welches mit 1 – 2 % Divinylbenzol kreuzvernetzt ist. Einige der Phenylringe sind dabei funktionalisiert (z.B. mit Chlormethyl-Gruppen im Falle des Merrifield-Harzes^[48]), um die Verknüpfung mit kleinen Molekülen zu erlauben. Für speziellere Anforderungen existieren auch Polyamin-, Polystyrol-Polyethylenglycol- (Tentagel^[50], ArgoGel^[51], Champion I+II^[52]), Polyacrylamid-^[53], Polyethylenglycol-Polyacrylamid-Copolymer- (PEGA)^[54] und reine Polyethylenglycol-Harze (PEG).^[55-57] Je nach Anwendung muss ein Harz ausgewählt werden, welches mit den Reaktionsbedingungen kompatibel ist. Dafür muss es in den verwendeten Lösemitteln ausreichend aufquellen, um freie Funktionalitäten des Harzes für die Reaktanten zugänglich zu machen, sowie der mechanischen Belastung und den Temperaturen während der Synthese widerstehen. Des Weiteren muss das Harz inert und stabil gegenüber sämtlichen verwendeten Reagenzien, wie z.B. starken Säuren oder Basen, sein.

2.1.3. Probleme der modernen Wirkstoffentwicklung

Von den derzeit zugelassenen Medikamenten ist der Großteil der Gruppe der niedermolekularen Wirkstoffe (engl. *Small Molecules*) zuzuordnen. Ebenso handelt es sich häufig bei den im Hochdurchsatz-*Screening* z.B. über kombinatorische Chemie gewonnenen Substanzbibliotheken und den daraus identifizierten Leitstrukturen um niedermolekulare Verbindungen. Niedermolekulare Wirkstoffe bezeichnen dabei Verbindungen, deren Molekülmasse 800 g/mol nicht überschreiten. Mit ihrer geringen Größe sind sie teilweise noch in der Lage, Zellmembranen zu überwinden und ihre Wirkung innerhalb der Zellen zu entfalten.^[58-60] Sie können meistens mit Mitteln der klassischen chemischen Synthese hergestellt werden und grenzen sich von den größeren Biomolekülen, sogenannten Biologika, wie z.B. Proteinen, ab. Aufgrund ihrer Größe ist es manchen niedermolekularen Therapeutika sogar möglich, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.^[58,61]

Ein Nachteil dabei ist allerdings, dass die niedermolekularen Wirkstoffe häufig eher hydrophober Natur sind und ihre kleinen Strukturen wenig Raum für Modifikationen lassen, ohne deren therapeutische Potenz negativ zu beeinflussen. Rund 40 % der auf dem Markt befindlichen Wirkstoffe sind schlecht wasserlöslich.^[58,62] Treffer aus Hochdurchsatz-*Screenings* und Leitstrukturen für die Entwicklung folgen ebenso dem Trend, immer häufiger sehr hydrophober Natur zu sein. Somit sind die meisten der zur Zeit in der Entwicklung befindlichen Wirkstoffe (ca. 75 %) ebenfalls schlecht wasserlöslich.^[58] Die Gründe dafür sind vielschichtig, wie zum Beispiel die Anwendung von kombinatorischer Chemie und HTS mit großen Substanzbibliotheken, welche oft in nicht-wässrigen Medien oder Lösemittelgemischen durchgeführt werden. Bei diesen Tests wird z.B. häufig Dimethylsulfoxid (DMSO) also Co-Solvent verwendet, da es sehr gute Löslichkeitseigenschaften, eine niedrige chemische Reaktivität und einen niedrigen Dampfdruck besitzt. Außerdem wird die Bindung von niedermolekularen Wirkstoffen an Ziele wie Enzyme oder Rezeptoren, um deren Aktivität zu modulieren, zumindest teilweise durch hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt. Somit werden ebenfalls hydrophobe Wirkstoffkandidaten für den Zugang und die Interaktion mit diesen Zielen benötigt.

Schlechte Wasserlöslichkeit von Wirkstoffen stellt ein ernstes Problem dar, da sie sich negativ auf alle Stufen der Pharmakokinetik, wie der Aufnahme in die Blutbahn, die Verteilung im Organismus, die Verstoffwechselung und die Ausscheidung (engl.: *Absorption, Distribution,*

Metabolism, Excretion, ADME), auswirkt.^[63] Zusätzlich kann auch noch die Freisetzung aus der Formulierung (engl.: *Liberation, LADME*) ein wichtiges Kriterium für die Pharmakokinetik darstellen, wenn der Wirkstoff zum Beispiel nicht bereits in seiner gelösten Form vorliegt. Gerade oral zu verabreichende Medikamente müssen gelöst sein, um absorbiert werden zu können. Die bekanntesten Maßstäbe bzw. Daumenregeln für die orale Bioverfügbarkeit eines niedermolekularen Wirkstoffs sind die von Chris Lipinski 1997 aufgestellten „*rule-of-five*“.^[60] Danach sollten Moleküle nicht mehr als fünf Wasserstoffbrücken-Donatoren und zehn -Akzeptoren besitzen, ihr Molekulargewicht sollte nicht über 500 g/mol liegen und ihr Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (log P) nicht über fünf. Wirkstoffe mit niedriger Wasserlöslichkeit haben eine niedrige und variierende Bioverfügbarkeit und damit Schwankungen in ihrer klinischen Ansprechrate.^[58] Aufgrund dessen wird während der Leitstrukturoptimierung besonderes Augenmerk auf die physikochemischen Eigenschaften gerichtet. Auch werden schon bei der Wirkstoffentdeckung strenge Kriterien angewendet, um Kandidaten auszuschließen, die während der Entwicklung der Struktur keine große Wahrscheinlichkeit besitzen, durch synthetische Modifikation zumindest eine mäßige Wasserlöslichkeit zu erreichen.

2.2. Medikamententransporter

Da immense Kosten durch die Notwendigkeit der Leitstrukturoptimierung im Hinblick auf die Wasserlöslichkeit oder gar durch das Scheitern eines Kandidaten verursacht werden, gewinnen Ansätze wie Medikamententransporter zunehmend an Bedeutung. Damit ist es möglich, durch Formulierungsadditive die physikochemischen Eigenschaften hin zu besserer Löslichkeit und Bioverteilung zu optimieren, ohne die Leitstruktur selbst modifizieren zu müssen.^[63,64] Das senkt zum einen die Kosten der Leitstrukturoptimierung und minimiert gleichzeitig das Risiko, dass die Leitstruktur durch die chemische Modifikation ihre Wirksamkeit verliert. Zum anderen können mit Transportsystemen gegebenenfalls sogar Medikamentenkandidaten eine Zulassung erreichen, welche in den späten klinischen Studien z.B. an schlechter Bioverteilung im Organismus bereits gescheitert sind. Somit lassen sich die bis dahin nötigen Investitionen in einen Kandidaten möglicherweise retten. Dabei bietet die Entwicklung einer neuen Formulierung oder eines Transporters im Vergleich zur Entwicklung eines komplett neuen Wirkstoffs auch deutliche wirtschaftliche Vorteile. Zum einen kann ein

auslaufendes Patent durch eine neuartige Formulierung des Wirkstoffs einen neuen Lebenszyklus erhalten. Des Weiteren sind die Kosten und der Zeitaufwand für die Entwicklung eines Transporters mit rund 20-50 Millionen Dollar und 3-4 Jahren deutlich geringer als die Entwicklung eines vollständig neuen Medikaments.^[65] Seit dem ersten im Jahre 1990 von der FDA zugelassenen Wirkstoff, welcher mit einem Formulierungsadditiv gelöst wurde (liposomalem Amphotericin B) haben zahlreiche Wirkstofftransporter die Zulassung und Marktreife erreicht.^[66]

Die Verwendung eines Formulierungsadditivs oder Medikamententransporters verfolgt in der Regel das Ziel, schlecht wasserlösliche Wirkstoffe einem biologischen System zu Verfügung zu stellen und die Bioverteilung zu verbessern, um eine Therapie überhaupt erst zu ermöglichen. Ebenso soll die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen erhöht werden, indem ein vorzeitiger Abbau oder das Ausscheiden des Wirkstoffs verhindert und eine bessere Aufnahme in Zellen erreicht wird. Außerdem kann z.B. bei Depotarzneiformen, welche durch Retardierung den Wirkstoff über einen langen Zeitraum freisetzen, die Konzentration des Wirkstoffs länger innerhalb seines therapeutischen Fensters gehalten werden. Wird ein bestimmter Wirkort oder ein Zelltyp mit den Transportern angesteuert (engl.: *Targeting*), so kann das außerdem durch den transportierten Wirkstoff verursachte Nebenwirkungen vermindern, da das *Targeting* der Behandlung geringere Dosen erlaubt. Durch das meist deutlich höhere Molekulargewicht eines Transporters im Vergleich zu einem freien niedermolekularen Wirkstoff wird außerdem die Ausscheidung über die Nieren verringert.^[64] Des Weiteren ist es möglich, durch das Einkapseln oder Konjugieren eines Wirkstoffs an einen Transporter diesen abzuschirmen und so gegebenenfalls eine schnelle Erkennung durch das Immunsystem zu verhindern. Dieser Effekt wird Tarnkappeneffekt (engl.: *Stealth*) genannt. Dadurch wird der Aktivierung des Immunsystems mit der Folge der Bedeckung des Fremdkörpers mit Antikörpern (Opsonisierung) und unspezifischen Wechselwirkungen mit Blutbestandteilen entgegengewirkt.^[67] Fortschritte in den Materialwissenschaften erlauben mittlerweile auch Trägermaterialien, die biokompatibel, bioabbaubar und mit zielsuchenden (*Targeting*) und stimulus-responsiven Eigenschaften ausgestattet sind.

2.2.1. Polymere Wirkstofftransporter

Medikamententransporter existieren aus verschiedensten Materialien, wie z.B. Lipide, anorganische Nanopartikel oder natürliche Biopolymere wie Proteine. Insgesamt finden aber hydrophile, synthetische Polymere die breiteste Anwendung in der Medizin, sowohl in ihrer löslichen, als auch in ihrer unlöslichen Form (Hydrogel). Dabei werden sie in Kliniken und klinischen Studien für die Modifikation von Proteinen oder Liposomen, als Oberflächenmodifikation von Biomaterialien und als Medikamenten-, Gen- und Oligonucleotidtransporter eingesetzt. Ideal für diese Anwendungen sind neutrale, synthetische und wasserlösliche Polymere, welche inert im Organismus sind.

Die naheliegendste Variante einen Wirkstofftransporter auf Polymerbasis zu erzeugen, ist die direkte kovalente Verknüpfung des Wirkstoffs mit einem Makromolekül, die sogenannten Polymer-Wirkstoff-Konjugate (**Abbildung 3A**).^[68,69] Bereits in den 1960-70er Jahren wurde dieser Ansatz erfolgreich angewendet. Jatzkewitz *et al.* zum Beispiel benutzten einen Dipeptid-Linker (GL), um Meskalin mit Polyvinylpyrrolidon zu verknüpfen^[70], während Ushakov *et al.* Konjugate aus Polyvinylpyrrolidon mit diversen Antibiotika synthetisierte.^[71] Auch Konjugate von zahlreichen Krebsmedikamenten für die Chemotherapie, wie Polyhydroxypropylmethacrylamid-Doxorubicin (HPMA-DOX)^[72,73], HPMA-Paclitaxel^[74] und HPMA-Platinat^[75] wurden bereits untersucht.

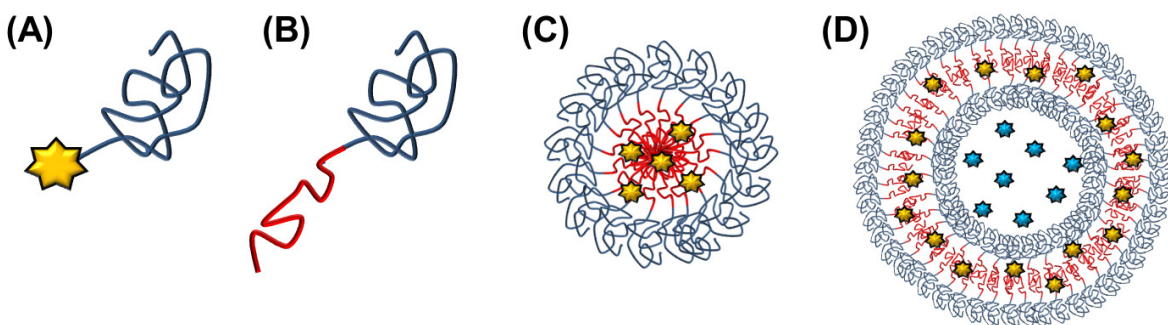


Abbildung 3. Beispiele für Polymere als Wirkstofftransporter: (A) Wirkstoff-Polymer-Konjugate, (B) Blockcopolymere und daraus mögliche Aggregatformen (C) Mizellen und (D) Polymersomen. Wirkstoffe/Gastmoleküle sind als Sterne dargestellt (gelb: hydrophob, blau: hydrophil).

Es konnte gezeigt werden, dass das Konzept, niedermolekulare Wirkstoffe an Polymere zu binden, die Biokompatibilität deutlich erhöht und Nebenwirkungen verringert. Dies führt gleichzeitig zu einer höheren maximal tolerierten Dosis (MTD) des Wirkstoffs in seiner Form als Polymerkonjugat im Vergleich zum freien Wirkstoff. Interessanterweise induziert HPMA-konjugiertes DOX zusätzlich keine multiple Wirkstoffresistenz (engl.: *Multiple drug resistance*, MDR) in humanen Ovarialkarzinomzellen, anders als der freie Wirkstoff.^[76] Auch in Tiermodellen konnte die Überwindung von MDR mit Wirkstoff-Polymer-Konjugaten gezeigt werden.^[77,78]

Bei den Wirkstoff-Polymer-Konjugaten werden meist Homopolymere für die Konjugation verwendet. Aber auch Copolymere, insbesondere Blockcopolymere (**Abbildung 3B**), besitzen eine hohe Relevanz für die Anwendung als Wirkstofftransporter. Durch die kovalente Verknüpfung von verschiedenen Homopolymerblöcken können hier völlig neue Eigenschaften des Blockcopolymers im Vergleich zu seinen einzelnen Homopolymerblöcken erzeugt werden. Gerade für die Formulierung von Wirkstoffen sind dabei amphiphile Blockcopolymere weit verbreitet. Dabei können Wechselwirkungen mit Wirkstoffen und die spontane Aggregation von Blockcopolymeren in Lösung zum Beispiel über hydrophobe, aromatische und ionische Wechselwirkungen, sowie Wasserstoffbrücken und entropische Effekte vermittelt werden.^[79] In den späten 1980er und frühen 1990er Jahren entwickelte Kataoka *et al.* ein mizellares Wirkstofftransporter-System in Form eines A-B-Blockcopolymers aus PEG und Polyaspartat, welches mit 4-Phenyl-1-butanol modifiziert wurde, um die Hydrophobizität des Blocks zu erhöhen.^[80] Durch die Amphiphilie des Blockcopolymers, bewirkt durch einen hydrophilen PEG-Block und ein hydrophobes, modifiziertes Polyaspartat, bilden sich in wässriger Lösung kolloidale Aggregate, sogenannte Blockcopolymer-Mizellen.^[81,82] Der Kern der Mizellen besteht dabei aus den hydrophoben Polymerblöcken, in dem ebenfalls hydrophobe, schlecht wasserlösliche Wirkstoffe gespeichert werden können (**Abbildung 3C**). Die Blockcopolymer-Wirkstofftransporter von Kataoka *et al.* befinden sich mittlerweile in der Phase II der klinischen Studie, um als Transporter für Paclitaxel und Doxorubicin zugelassen zu werden. Ein zweites Beispiel ist ein Polyethylenoxid-Polypropylenoxid-Polyethylenoxid-Triblockcopolymer (PEO-PPO-PEO, Pluronic[®]), welches von Kabanov *et al.* entwickelt wurde.^[66,83] Es befindet sich in Phase III der klinischen Studie als Transporter für Doxorubicin. Die mizellaren Wirkstofftransporter stießen außerdem die Entwicklung von Dendrimeren und sternförmigen, amphiphilen

Blockcopolymeren als Wirkstofftransporter an, mit denen eine deutlich bessere Kontrolle über die Größe, Form und Oberflächenfunktionalität der Mizellen erreicht werden kann.^[84]

Ein andere Form von Aggregaten, die sich aus Blockcopolymeren in wässriger Umgebung bilden, sind Polymersomen.^[85,86] Der Begriff leitet sich von den Liposomen ab, welche ein- (unilamellar) oder mehrschichtige (multilamellar) Vesikel aus Lipiden darstellen, die ein wässriges Lumen umschließen (**Abbildung 3D**). Auch hier können Wirkstoffe durch nichtkovalente Wechselwirkungen eingeschlossen werden. Hydrophobe Wirkstoffe können in die Doppelschichten der Hüllen eingelagert werden und hydrophile in das wässrige Reservoir, welches durch die Hülle vom umgebenden Lösemittel abgeschirmt ist. Liposomen selbst oder Lipid-basierende Systeme sind zur Zeit aus Sicht der Zulassungszahlen die erfolgreichsten Wirkstofftransporter für klinische Anwendungen.^[87] Sie können durch Endozytose in Zellen internalisiert werden und Lipid / Polymer-Partikel können sogar multiple Wirkstoffresistenzen umgehen.^[88,89] Es lassen sich auch Liposomen sehr erfolgreich mit Polymeren kombinieren. So konnte gezeigt werden, dass durch das Hinzufügen einer Schicht von PEG-Bürsten die Zirkulationshalbwertszeit von Liposomen in der Blutbahn deutlich erhöht wird.^[90] Liposomen und Polymersomen lassen sich relativ einfach und sehr vielseitig modifizieren, indem ein weiteres, funktionalisiertes Lipid oder Polymer hinzugegeben wird. Bei der Aggregatbildung in wässriger Umgebung werden diese Komponenten dann in die Partikel eingebaut und es werden Multikomponenten-Systeme erhalten.^[89,91,92] Das kann zum Beispiel Fluoreszenzsonden oder Kontrastmittel für bildgebende Diagnostik, Liganden für *Targeting* (Antikörper, Peptide, Proteine, Aptamere, Zucker-Reste, niedermolekulare Verbindungen), Zell-penetrierende Peptide für interzelluläre Akkumulation oder bioabbaubare bzw. durch interne (pH-Wert, reduktives Milieu in Zellen, Enzyme) und externe (Magnetische Felder, Licht, Ultraschall, Hyperthermie) Stimuli schaltbare Gruppen für kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffs beinhalten.

Als Alternative zu Lipid-basierten Systemen werden häufig Partikel aus bioabbaubaren Polymeren angesehen, da diese eine deutlich höhere Stabilität *in vivo* aufweisen.^[93] Bioabbaubarkeit von Polymeren bezieht sich dabei auf die enzymatische oder chemische Zersetzung im Zusammenhang mit lebenden Organismen oder deren Ausscheidungen.^[94] Durch die Bioabbaubarkeit kann dabei die Geschwindigkeit der Freisetzung von

Gastmolekülen geregelt werden. Dabei sind Polylactide (PLA), Polyglycolide (PGA) und deren Co-Polymere Polylactid-co-Glycolide (PLGA) dank der einfachen Herstellung und deren Bioabbaubarkeit und Bioverträglichkeit die am weitesten verbreiteten Vertreter.^[95,96] Die Freisetzungskinetik eines Wirkstoffs aus einem PLGA-Partikel kann dabei über das PLA / PLG-Verhältnis, die Größe der Partikel und ihre Oberflächenbeschaffenheit gesteuert werden, welche die Rate des Abbaus bestimmen.^[97,98] Zusätzlich können PLGA-Nanopartikel mit *Targeting*-Motiven, PEGylierung oder umgebungsresponsiven Eigenschaften ausgestattet werden.^[99,100] Ein anderes Beispiel für bioabbaubare Wirkstofftransporter sind HPMa-Konjugate mit enzymatisch spaltbarem Rückgrat, welches durch den Einbau kurzer Peptidsequenzen erreicht wird.^[101] Auch ist es möglich, natürliche Proteine wie Human Serum Albumin miteinander kovalent zu vernetzen, um bioabbaubare Biopolymer-Nanopartikel für den Zweck des Wirkstofftransportes zu erhalten. Diese Methode wurde unter anderem genutzt, um Photosensibilisatoren für die photodynamische Krebstherapie zu solubilisieren und mittels Endozytose in Krebszellen einzuschleusen.^[102,103]

2.2.2. Polyethylenoxid (PEO)

Polyethylenoxid (PEO, oder Polyethylenglycol, PEG) ist das am häufigsten verwendete Polymer für biomedizinische Anwendungen.^[104] Es ist ein wasserlöslicher, linearer, chemisch inerte und nicht toxischer Polyether. PEO bindet große Mengen Wasser, so dass es durch diese stabile Hydrathülle stark abschirmende Effekte hat. Wasserstoffbrückenbindungen zu Wassermolekülen sind die Haupttriebkraft für die Lösung von PEO, so dass erst die Hydratisierung der Sauerstoffatome es wasserlöslich macht. Bei erhöhten Temperaturen wird PEO zunehmend hydrophob und kann ausfallen, sobald eine untere kritische Lösungstemperatur (engl.: *lower critical solution temperature*, LCST) überschritten wird. Die zunehmende Hydrophobizität erhöht hierbei die Wechselwirkungen zwischen PEO-Ketten und die Hydrathülle wird teilweise abgestoßen.^[105,106] Für die meisten reinen, linearen PEO-Formen ist dieser Punkt allerdings höher als der Siedepunkt von Wasser. Dieser Effekt kann genutzt werden, um eine dichter gepackte Beschichtung von Oberflächen mit PEO-Copolymeren zu erreichen.^[107] Durch die Beschichtung von Oberflächen werden Wechselwirkungen mit Biomaterialien unterbunden, sodass PEO auch gegen pathogene Bakterien und Pilzinfektionen (engl.: *Anti-Fouling*) schützt.^[108] Des Weiteren ist PEO im Hinblick auf die Anwendung als Medikamententransporter in Lösung das am meisten für die

Verbesserung der Wasserlöslichkeit und für *Stealth* eingesetzte Polymer. Hier reduziert es ebenso die Tendenz zu Aggregation von Partikeln durch sterische Stabilisierung. Ein weiterer wichtiger Faktor für pharmazeutische Anwendungen ist der Polydispersitätsindex (PDI) des Polymers, welcher unterhalb von 1.1 liegen sollte, um ein ausreichend homogenes Material für reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Heutzutage lassen sich mit anionischer Polymerisation sehr definierte PEOs mit einem PDI von 1.01 herstellen. Da PEO auch in vielen organischen Lösemitteln wie Toluol, Dichlormethan, Ethanol und Aceton löslich ist, lässt es sich relativ leicht an seinen Endgruppen modifizieren.

Proteine mit PEO zu konjugieren wurde in den späten 1970er Jahren von Davis *et al.* etabliert.^[109] Ziel dabei war es, durch die Konjugation mit PEO eine höhere Beständigkeit therapeutisch wirksamer Proteine gegen proteolytischen Abbau zu erhalten, um eine längere Halbwertszeit in der Blutbahn zu gewährleisten. Durch den abschirmenden Effekt von PEO kann außerdem die Antigenität der Proteine durch die Konjugation mit dem Polymer verringert, sowie Proteinadsorption und -aggregation verhindert werden.^[109] Das Konzept der PEGylierung lässt sich aber nicht nur auf Proteine anwenden. Verschiedene PEGylierte Liposomen,^[110] Nanopartikel,^[111] aber auch Proteine^[112,113] als Medikamente befinden sich auf dem Markt. Über endgruppenfunktionalisierte PEO-Ketten lassen sich eine Vielzahl an Molekülen PEGylieren oder Oberflächen beschichten. Dabei können die Eigenschaften der PEGylierten Spezies über den Grad der Modifikation, die Kettenlänge des Polymers und deren Architektur (linear oder verzweigt) beeinflusst werden.

Die positiven Eigenschaften von PEO oder PEGylierung führten zu einer breiten Anwendung in Alltags-, Industrie- und Pharmazieprodukten und es wurden bisher zahlreiche pharmazeutische Produkte, welche PEO enthalten, von der FDA und der Europäischen Arzneimittel-Agentur (engl.: *European Medicines Agency*, EMA) zugelassen. Durch seine oberflächenaktiven und viskositätserhöhenden Eigenschaften findet es sich außerdem in zahlreichen kosmetischen Produkten.^[114] Somit wird PEO höchstwahrscheinlich für biomedizinische Anwendungen zumindest für absehbare Zeit weiter alternativlos bleiben.

2.2.3. Peptid-Polymer-Konjugate

Synthetische Polymere wie PEO werden in der Regel durch die Verknüpfung von Monomeren eines oder, im Falle von Co-Polymeren, einiger weniger Typen hergestellt. Wechselwirkungen mit anderen Molekülen sind daher meist wenig spezifisch und beruhen auf einfachen Konzepten, wie z.B. ähnlicher Hydrophilie. In der Natur hingegen sind nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen Biopolymeren wie z.B. Proteinen mit anderen Molekülen sehr präzise und werden über die exakte Anordnung verschiedener Monomere mit unterschiedlichen Funktionalitäten in einer Monomersequenz, auch Primärstruktur genannt, gesteuert. Präzise, nichtkovalente Wechselwirkungen sind ein omnipräsentes Konzept, um Gastmoleküle zu transportieren, Stoffwechselprozesse durchzuführen oder zu regulieren, Signalkaskaden auszulösen, Fremdkörper zu erkennen und abzubauen und vieles mehr.^[115-119] Die dabei erreichte Präzision der Wechselwirkungen zwischen einzelnen funktionellen Gruppen des Wirts und des Gastmoleküls machen die Existenz höher entwickelter Lebensformen erst möglich und ist im Vergleich zu künstlichen, von Menschenhand erschaffenen Systemen bei weitem unerreicht. Zum Beispiel wäre die Versorgung von Wirbeltieren mit Sauerstoff ohne die präzise Bindung und Freigabe von Sauerstoffmolekülen mittels Koordination über den Eisen(II)-Komplex (das Häm) von Hämoglobin unmöglich.^[120,121]

Dennoch existiert auf der anderen Seite eine Vielzahl an synthetischen Polymeren, deren Eigenschaften Biopolymere übertreffen können, welche sich aber gleichzeitig großtechnisch und vergleichsweise relativ kostengünstig herstellen lassen. Gerade die großvolumige Herstellung von verhältnismäßig einfachen Kunststoffen lässt sich durch Biopolymere nicht ersetzen. Aber auch spezialisierte Eigenschaften wie hohe Temperaturbeständigkeit, Leitfähigkeit, Bioabbaubarkeit, Thermoresponsivität oder Selbstheilung lassen sich mit synthetischen Polymeren realisieren.^[94,122-125] Die Ausbildung höherer Strukturen durch nichtkovalente Wechselwirkungen ist auch bei synthetischen Polymeren prinzipiell möglich, wie zum Beispiel durch Aggregation von Blockcopolymeren zu Mizellen oder Polymersomen.^[81,82,85,86] Längere monodisperse, definierte Monomersequenzen lassen sich heutzutage allerdings mit synthetischen Polymeren noch nicht realisieren, auch wenn es im vergangenen Jahrzehnt Fortschritte in der Sequenzkontrolle von Polymeren gegeben hat.^[79,126] Somit ist die Vielfalt und Komplexität von Biomolekülen wie Proteinen bezüglich ihrer

strukturbildenden Faltung und damit möglichen Funktionen durch künstliche Polymere derzeit nicht zu erreichen.

Ein Ansatz, um die Vorteile beider Stoffklassen zu kombinieren, ist die Verknüpfung von biologischen oder bioinspirierten, funktionellen Segmenten mit einem synthetischen Makromolekül, genannt Biokonjugat.^[127,128] Damit können funktionale Systeme erzeugt werden, die eine Schnittmenge der Vorteile von synthetischen und Biopolymeren bilden und vielfältige, faszinierende Eigenschaften besitzen. Konjugate von Peptiden oder Proteinen mit PEO/PEG sind die häufigsten Vertreter der Klasse von Peptid/Protein-Polymer-Konjugaten. Durch die Kombination beider Stoffklassen können Nachteile der jeweils einzelnen überwunden und neue Materialeigenschaften erzeugt werden. Dabei dient die klassische PEGylierung von therapeutischen Peptiden und Proteinen auch hier wieder häufig der Verlängerung der Zirkulation in der Blutbahn, verbesserter Stabilität gegen proteolytischen Abbau und verminderte Immunogenizität durch Abschirmung (*Stealth*).^[129]

Es existiert eine Vielzahl an Möglichkeiten, Peptid-Polymer-Konjugate herzustellen, angefangen bei chemoselektiven Kupplungen und spezifischen Modifikationen an bestimmten Aminosäureresten eines Biopolymers, über die Adaption von modernen Methoden der Festphasenpeptidsynthese (engl.: *Solid Phase Peptide Synthesis*, SPPS) und Techniken der kontrollierten Polymerisation (**Abbildung 4**).^[130,131] Eine vielversprechende Strategie ist die Verknüpfung eines monodispersen Peptidblocks einer definierten Aminosäuresequenz an ein Polymer, um ein Hybridmaterial mit synergistischen Eigenschaften aus beiden Materialklassen zu erhalten. Es handelt sich dabei meist um synthetische Peptide, hergestellt mittels Festphasenpeptidsynthese. Sie können aber auch aus natürlichen Quellen gewonnen werden.^[132]

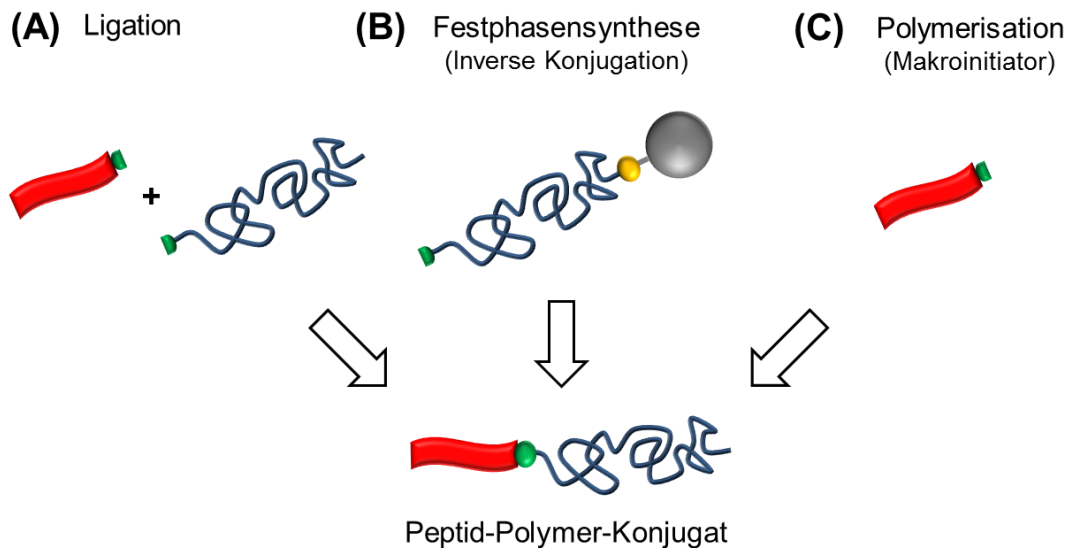


Abbildung 4. Schematische Darstellung möglicher Strategien für die Präparation von Peptid-Polymer-Konjugaten.^[131]

Der Polymerblock kann nachträglich durch die selektive Reaktion an einer Seitenkettenfunktionalität einer bestimmten Aminosäure oder den *N*- bzw. *C*-Terminus eines Peptids oder Proteins an das Biopolymer gekuppelt werden. Die Möglichkeiten der Funktionalisierung sind vielfältig, angefangen bei der gängigen Reaktion der ϵ -Aminofunktion von Lysinresten mit Carbonsäuren, Aldehyden, Ketonen und Iso(thio)cyanaten.^[133,134] Die unterschiedlichen pK_a -Werte der Aminofunktionen des *N*-Terminus (~ 7.8), der Lysin- (~ 10.5) und Arginin-Seitenkette (~ 12.0) erlauben auch die selektive Reaktion am *N*-Terminus mit diesen Methoden.^[135] Die Carbonylgruppen von Aspartat, Glutaminsäure und des *C*-Terminus lassen sich ebenfalls mit Methoden der SPPS funktionalisieren.^[136] Im Allgemeinen kommen zum Beispiel Lysin und Glutaminsäure aber relativ häufig in Proteinen vor, wodurch die Reaktionen eher unspezifisch sind. Cystein hingegen besitzt in natürlichen Proteinen ein Vorkommen von ca. 1.5 %. Viele der Cysteinreste sind außerdem in Disulfidbrücken gebunden, was sich allerdings durch die Zugabe von Reduktionsmitteln aufheben lässt.^[133] Die freien Thiolgruppen der Cystein-Seitenkette reagieren irreversibel unter anderem mit Maleimiden oder Vinylsulfonen.^[137] *N*-terminale Cystein-Reste wiederum bieten einen Angriffspunkt für die native chemische Ligation (NCL) mit einem Thioester.^[138] Auch für andere Aminosäuren existieren eine Vielzahl an selektiven Reaktionsstrategien.^[130]

Wird das Konjugat auf diese Weise erzeugt, so gilt es bei der Auswahl der Konjugationsstrategie darauf zu achten, dass das Polymer nicht die Funktion oder die gegebenenfalls notwendige Faltung des Peptids oder Proteins in eine höhere Struktur behindert. Gerade bei Proteinen, die nur aus kanonischen Aminosäuren aufgebaut sind, ist die ortsspezifische Reaktion an einen bestimmten Rest schwierig, da jede Aminosäure in der Regel mehrmals vorkommt. Das Problem kann allerdings umgangen werden, indem unnatürliche Aminosäuren verwendet werden, an denen relativ einfach ortsspezifische Funktionalisierungen und Konjugationen durchgeführt werden können.^[127]

Bei Peptiden, die mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt werden, lässt sich das Problem durch Schutzgruppen umgehen. Spezielle Schutzgruppen erlauben die selektive Entschützung einzelner funktioneller Gruppen, an welchen dann die gewünschten Reaktionen durchgeführt werden können.^[139] Dabei werden die Schutzgruppen so gewählt, dass die bei der Festphasenpeptidsynthese für den *N*-Terminus und die Seitenkettenfunktionen verwendeten Schutzgruppen nicht abgespalten werden. Außerdem können über die selektive Entschützung des *N*-Terminus während der Synthese, sowie die Verwendung spezieller Linker-Moleküle für den *C*-Terminus, wie Weinreb-Amid-Linker für *C*-terminale Aldehyde^[140] oder Sulfonamid-Linker, um Thioester für NCL oder Staudinger-Ligation^[141,142] zu generieren, auch die Termini für Konjugationen verwendet werden.

Das Einbringen unnatürlicher Aminosäuren an gewünschten Stellen der Aminosäuresequenz eines Peptids ist hingegen mit der Festphasenpeptidsynthese am besten möglich. Es ist mit Suppressor-tRNA auch bei rekombinant gewonnenen Proteinen realisierbar, doch sehr aufwendig, kostenintensiv und es können nur geringe Mengen an modifiziertem Protein gewonnen werden.^[143] Es sind diverse unnatürliche Aminosäuren erhältlich, welche sich orthogonal zu den natürlichen Aminosäuren und unter milden Bedingungen funktionalisieren lassen.^[130] Beispiele dafür sind die metallkatalysierte Metathese an Alkenyl- oder Alkynylgruppen,^[144,145] die Heck-Reaktion an aktivierten Alkenen,^[146] die Suzuki-Kupplung mit Borsäureestern^[147] und die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) nach Huisgen (*Click-Chemie*).^[148]

Es ist auch möglich, einen sogenannten *Fusions-Tag* zu verwenden. Das sind kurze Aminosäuresequenzen, welche von Enzymen erkannt werden können. So wird zum Beispiel

eine C-terminale Tetramer-Sequenz Cys-Val-Ile-Ala von der Farnesyltransferase (FTase) gebunden, welche dann selektiv Farnesyl-Moleküle über einen Thioether an die Cystein-Seitenkette knüpft. Da die FTase auch modifizierte Farnesyl-Substrate toleriert, können z.B. Alkin-Gruppen eingebracht werden, welche später chemoselektiv über kupferkatalysierte Cycloaddition mit einem Azid (*Click-Chemie*) funktionalisiert werden können.^[149,150]

Die beschriebenen Methoden verfolgen hauptsächlich das Ziel, ein vorhandenes Peptid oder Protein mit einem fertigen Polymer zu verknüpfen. Problematisch bei diesem Ansatz ist allerdings, dass die funktionellen Gruppen bei Makromolekülen häufig schlecht zugänglich sind, was sich negativ auf die Reaktionsrate auswirkt. Außerdem sind die Charakterisierung des Produktes und die Trennung von Edukten oder Nebenprodukten bei Konjugaten häufig sehr kompliziert. Das Polymer selbst besitzt schon eine gewisse Polydispersität und bei der Reaktion mit kleinen Peptiden reichen die Unterschiede bezüglich der Eigenschaften wie Molekulargewicht oder hydrodynamischen Volumens in der Mischung häufig nicht für eine saubere Trennung aus.^[151,152] Bei der Kupplung an einer festen Phase, zum Beispiel im Anschluss an die Synthese eines Peptids mittels SPPS, lässt sich nicht abreagiertes Polymer leicht entfernen. Eine Herausforderung ist allerdings der häufig hohe sterische Anspruch der Polymere, aufgrund dessen sie nur schlecht in die bei der SPPS verwendeten Polymerharze diffundieren können. Daher können oft nur Peptide an der Oberfläche reagieren und die Ausbeuten sind entsprechend schlecht.

Statt einer Verknüpfung fertiger Segmente kann die Polymerisation des Polymerblocks auch direkt an einem peptidischen Makroinitiator durchgeführt werden.^[153,154] Monomethyl-Polyethylenglycol-Methacrylat konnte zum Beispiel mittels Atom-Transfer-Radikal-Polymerisation (ATRP) an einem Makroinitiator, gewonnen aus Chymotrypsin oder Bovin Serum Albumin, polymerisiert werden.^[155] Problematisch für die Verwendung von radikalischer Polymerisation sind allerdings Cystein-Reste im Peptid / Protein, da diese als Kettentransferreagenzien wirken.

Andererseits kann auch das Peptid schrittweise an einem existierenden Polymer synthetisiert werden. Das ist sowohl in Lösung, also auch an einer festen Phase möglich. Für die Reaktion in Lösung kann die unterschiedliche Löslichkeit des Polymers in verschiedenen Lösemitteln genutzt werden, um es zwischen den Syntheseschritten auszufällen.^[156] Mit wachsender Peptidkette können sich allerdings die Eigenschaften des Makromoleküls ändern, so dass

Isolation und Aufreinigung des Produktes gegebenenfalls nicht mehr möglich ist. Eine Methode, welche auch in dieser Arbeit verwendet wurde, um Peptid-PEO-Konjugate in hoher Reinheit und guten Ausbeuten direkt zu erhalten, ist die inverse Konjugations-Strategie (**Abbildung 5**).^[157-159] Es handelt sich dabei um eine Variante der Festphasenpeptidsynthese, bei der ein spezielles, bereits mit dem Polymerblock vorbeladenes Festphasenharz genutzt wird. Der Polymerblock verfügt an seinem freien Ende über ein primäres Amin, an welchem die Peptidsynthese direkt durchgeführt werden kann. Zwischen Polymerblock und dem festen Trägermaterial (z.B. Polystyrol) befindet sich ein spaltbares Linker-Molekül. Somit kann nach der Synthese der gewünschten Aminosäuresequenz das Linker-Molekül gespalten werden und das fertige Konjugat durch Filtration vom Trägermaterial getrennt werden.

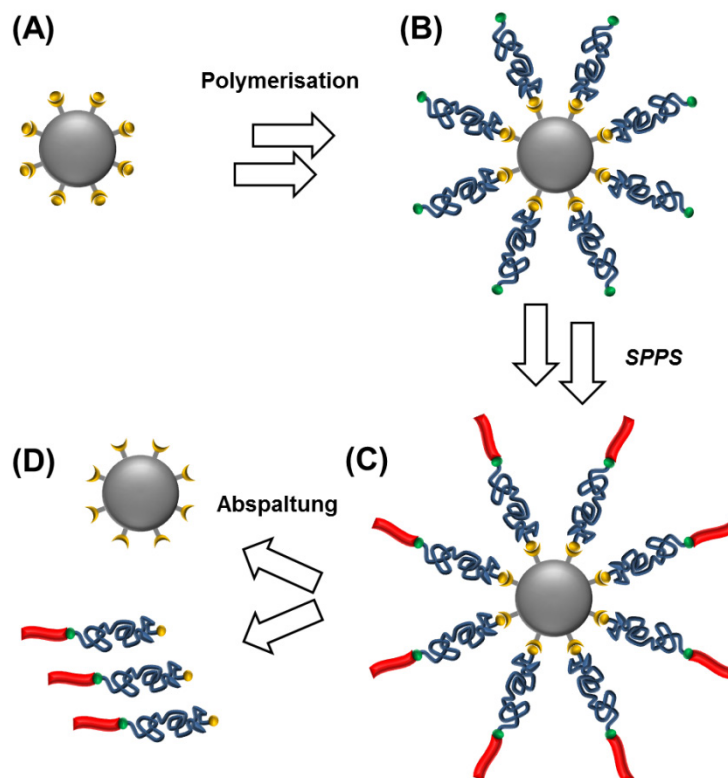


Abbildung 5. Schematische Darstellung der Synthese eines Peptid-PEO-Konjugats nach der inversen Konjugations-Strategie. An einem festen Trägermaterial (A), wird die Polymerisation des PEOs (B) durchgeführt. Anschließend kann die Festphasenpeptidsynthese (SPPS) direkt am PEO durchgeführt werden (C), um die fertigen Konjugate zu erhalten (D).

Damit ist das funktionelle Segment des Blockcopolymers monodispers und vollständig sequenzkontrolliert, womit die hier im Focus liegenden Peptid-PEO-Konjugate zu den sogenannten Präzisionspolymeren gehören.^[79,160] Die Sequenzen sind dabei präzise und frei veränderbar, so dass die Eigenschaften des Makromoleküls in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz systematisch studiert werden können. So wurden in jüngster Zeit einige interessante Anwendungen von Peptid-PEO-Konjugaten vorgestellt, wie die spezifische Bindung von niedermolekularen Wirkstoffen, die Steuerung von Kristallisationsprozessen, Schaltung von selbstorganisierenden Nanomaterialen oder die Beschichtung von Nanopartikeln und Materialoberflächen.^[79,161-167]

Ein moderner Ansatz ist die Nutzung von biokombinatorischen Methoden wie dem Phagen Display, um geeignete Aminosäuresequenzen für die Beschichtung von Nanomaterialen zu identifizieren. Schwemmer *et al.* selektierten mit dieser Methode Aminosäuresequenzen, die zu einer peptidvermittelten Haftung von Peptid-PEO-Konjugaten zur Abschirmung von Gadoliniumoxid-Nanopartikeln, einem Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie, in der Lage waren.^[166] Wilke *et al.* nutzten diese Methode, um, inspiriert von marinen Muscheln, enzymatisch aktivierbare Bindungsdomänen für Aluminiumoxid-Oberflächen zu selektieren.^[167] Die Aktivierung der Haft Eigenschaften konnte durch die Oxidation von Tyrosin-Resten zu *L*-3,4-Dihydroxyphenylalanin (*L*-DOPA) mittels des Enzyms Tyrosinase erreicht werden. Peptid-PEO-Konjugate, welche die selektierten Bindungsdomänen trugen, zeigten erst nach enzymatischer Aktivierung stark bindende Eigenschaften, sogar unter schwierigen Salzwasserbedingungen, und erzeugten eine stabile Beschichtung der Aluminiumoberfläche mit *Anti-fouling*-Eigenschaften und effektiver Abschirmung gegen Proteinabsorption. Diese Beispiele zeigen die Vielseitigkeit und Effektivität, die in der Kombination monodisperser, vollständig sequenzkontrollierter Peptid-Blöcke mit einem synthetischen, hydrophilen Polymer wie PEO steckt.

Hirsch und Börner *et al.* war es möglich, mit *de novo* designten Peptidsequenzen spezifische Löslichkeitsvermittler in Form von Peptid-PEO-Konjugaten für niedermolekulare Wirkstoffe zu entwickeln. Dabei vermittelten die Peptiddomänen die nichtkovalente Bindung der Wirkstoffe, während der PEO-Block Wasserlöslichkeit zum System beiträgt. Die verwendeten Zielmoleküle waren dabei Inhibitoren der Kinase IspE, welche als Ziel einer möglichen Therapie von infektiösen Erkrankungen wie Malaria und Tuberkulose identifiziert wurde.^[161]

Diese Inhibitoren waren zum Teil vollständig wasserunlöslich, was ihre biologische Aktivität hinderte.^[161,162] Mit dieser Methode konnte für einen der Inhibitoren das erste Mal überhaupt ein IC₅₀-Wert bestimmt werden. Die monodispersen Peptidsegmente der Konjugate bargen dabei die Möglichkeit, eine hohe Spezifität der nichtkovalenten Bindung von niedermolekularen Wirkstoffen zu erreichen, welche mit einfachen Reservoir- oder Matrix-System nicht möglich ist. Somit stellt die Verwendung von Peptid-PEO-Konjugaten als Löslichkeitsvermittler und Medikamententransporter einen vielversprechenden Ansatz dar, um die physikochemischen Eigenschaften von unlöslichen Wirkstoffen zu verbessern.

2.2.4. Targeting bei *Drug-Delivery*-Systemen

Neben der reinen löslichkeitsvermittelnden Wirkung oder dem Abschirmen von Wirkstoffen durch Transporter, ist ein noch ehrgeizigeres Ziel der selektive Transport des Wirkstoffs zu seinem therapeutischen Ziel. Dies wird im Allgemeinen mit dem englischen Begriff „*Drug Targeting*“, also der gezielten Pharmakotherapie, beschrieben. Beim *Drug Targeting* wird zwischen passivem und aktivem *Targeting* unterschieden. Passives *Targeting* nutzt Eigenschaften des Zielgewebes und der Transporter aus, die meistens auf Größeneffekte zurückgreifen. Aktives *Targeting* hingegen funktioniert über membranständige Rezeptoren der Zellen, die über das Verknüpfen zielführender Moleküle wie z.B. Antikörper mit den Transportern adressiert werden.

Bezogen auf das passive *Targeting* von Krebszellen ist meistens die Rede von der Ausnutzung des EPR-Effektes (engl.: *Enhanced Permeability and Retention*).^[168,169] Dieser Effekt beschreibt physiologische Unterschiede zwischen gesundem Gewebe und Krebsgewebe (**Abbildung 6**). Das Endothel von Blutgefäßen bei Tumorgewebe ist deutlich durchlässiger auch für größere Moleküle,^[170-172] während das Gewebe mit deutlich weniger Lymphgefäßen für den Abtransport von Wirkstoffen ausgestattet ist.^[170,171] Damit kann ein Wirkstoff/Transporter-Komplex, welcher sich in einer Größenordnung von 10 nm bis 200 nm im Durchmesser bewegt, deutlich besser in Tumorgewebe als in gesundes Gewebe gelangen. Gleichzeitig wird er nur langsam wieder von dort abtransportiert, was insgesamt zu einer Anreicherung des Wirkstoffs im Tumorgewebe führt.^[87,173] Außerdem verfügen Tumore über ein gesteigertes Wachstum mit erhöhter Stoffwechselaktivität und Durchblutung, wodurch sich zusätzlich noch mehr der Wirkstoff/Transporter-Komplexe im krankhaft

veränderten Gewebe ansammeln. Es konnte gezeigt werden, dass der EPR-Effekt für das *Targeting* von vielen Tumorarten genutzt werden kann.^[174-176] Die Größe der Poren des Endothels kann aber abhängig von der Art des Tumors und des Organs sein.^[176-179] Für die Behandlung von soliden Tumoren kann das passive *Targeting* über den EPR-Effekt^[169,180] und die Anpassung des Molekulargewichtes des Transporters^[181,182] ausreichend für eine effektive Behandlung sein.

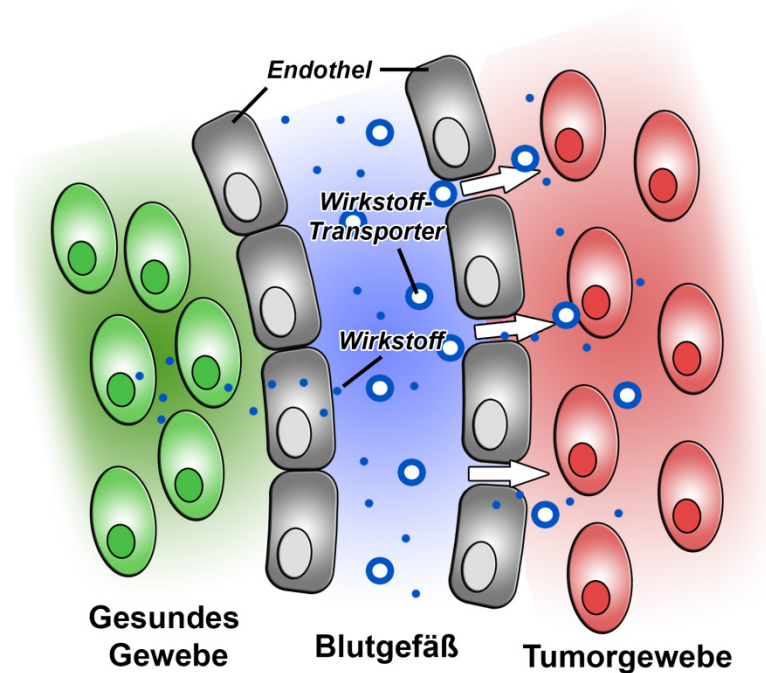


Abbildung 6. Schematische Darstellung des passiven *Targetings* über den EPR-Effekt. Im Vergleich zu gesundem Gewebe (grün) ist das Endothel von Tumorgebe (rot) durchlässiger. Somit können Wirkstoff-Transporter, welche durch die Blutgefäße zirkulieren, ab einer gewissen Größe vermehrt in Tumorgewebe eindringen, während freie, niedermolekulare Wirkstoffe auch in gesundes Gewebe diffundieren können.

Bei der zweiten Strategie, dem aktiven *Targeting*, werden die Wirkstoffe oder Transportermoleküle mit Liganden versehen, welche gegen Oberflächenmoleküle gerichtet sind, die für Zielzellen oder bestimmtes Gewebe spezifisch sind. Liganden für das aktive *Targeting* umfassen z.B. Antikörper, Peptide, Proteine, Aptamere, Zucker-Reste oder niedermolekulare Verbindungen.^[68,183] Häufig werden zellspezifische, membranständige Rezeptoren angesteuert, um den Wirkstoff an Zielzellen anzureichern oder optional über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zielzellen aufgenommen zu werden. Für besonders effektives *Targeting* kann der Transporter sowohl mit einem Biomolekül für die Erkennung durch einen Rezeptor verknüpft werden,^[184,185] als auch zusätzliche Schnittstellen besitzen,

welche von lysosomalen Enzymen erkannt werden. So wird der Transporter nach der Endozytose im Lysosomen gespalten bzw. abgebaut und der Wirkstoff freigesetzt, so dass dieser durch die Lysosomen-Membran in das Cytoplasma diffundieren oder in andere Organellen gelangen kann.^[186,187]

2.3. Photodynamische Therapie

Targeting über die Ausnutzung des EPR-Effektes und die Verwendung von Wirkstofftransportern, die an Antikörper gekoppelt sind, wird insbesondere in der Krebstherapie, z. B. der Chemotherapie maligner Tumoren, eingesetzt. Hier ist eine hohe Spezifität besonders wichtig, da möglichst zielgerichtet nur krankhaft verändertes Gewebe abgetötet werden soll, während gesunde Zellen idealerweise die Therapie möglichst unbeschadet überstehen sollen. Eine weitere, moderne und sehr zielgerichtete Methode der Krebstherapie ist die photodynamische Therapie (PDT), welche auf der Kombination eines Farbstoffs, genannt Photosensibilisator (PS), molekularem Sauerstoff und sichtbarem Licht einer bestimmten Wellenlänge (z. B. in Form eines Lasers) beruht (**Abbildung 7**). Zunächst wird dabei dem Patienten der PS meist systemisch, etwa intravenös, verabreicht. Während einer definierten Inkubationszeit verteilt sich der PS im Körper des Patienten und sammelt sich somit auch in geschädigten bzw. veränderten Zellen an, wodurch diese photosensibilisiert werden. Bei schwer löslichen PS geschieht die Verteilung häufig durch Blutplasma-Proteine (z.B. Serum Albumin und Lipoproteine), oder indem der PS bereits mit einem Transporter-System solubilisiert ist. Anschließend wird das Tumorgewebe lokal mit Licht bestrahlt. Durch die Bestrahlung wird der PS angeregt und erzeugt dabei durch photophysikalische Prozesse toxische Spezies, meist Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). Dieser wird aus in der Umgebung vorhandenem Sauerstoff erzeugt und führt zu Apoptose oder Nekrose der Zellen, wodurch das Tumorgewebe zerstört wird. Die PS sind idealerweise biologisch inert und ohne Bestrahlung inaktiv, so dass nur bestrahltes Gewebe zerstört wird.

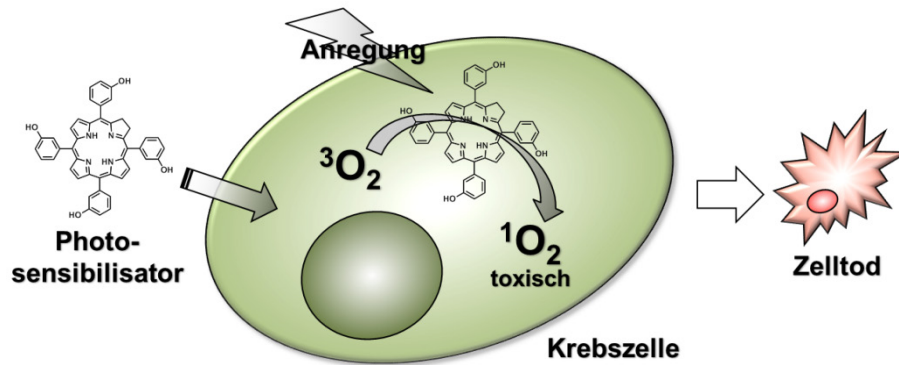


Abbildung 7. Prinzip der photodynamischen Krebstherapie: Nach Aufnahme des Photosensibilisators (PS) in eine Krebszelle wird dieser durch Bestrahlung mit einer geeigneten Lichtquelle in einen angeregten Zustand versetzt. Die Anregungsenergie kann auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, welcher dabei in den Singulett-Zustand (1O_2) übergeht. Der erzeugte 1O_2 schädigt die Zelle und der Zelltod in Form von Apoptose oder Nekrose wird eingeleitet.

Der Schwerpunkt der PDT ist die Behandlung von Krebserkrankungen, welche äußerlich oder endoskopisch mit einer Lichtquelle erreichbar sind, wie etwa Tumore im Kopf- und Halsbereich, Lungentumore, Speiseröhrenkrebs, Blasenkrebs und Hautkrebs.^[188,189] Ein anderes Beispiel wäre die in der Augenheilkunde angewendete Therapie der altersabhängigen Makulardegeneration (AMD) mittels PDT, bei der ohne chirurgischen Eingriff die Netzhaut durch die Pupille bestrahlt werden kann.^[190]

Der große Vorteil von PDT ist dabei die genau lokale Eingrenzung der Behandlung, da der PS nur bei Bestrahlung mit Licht der passenden Wellenlänge aktiv wird. Dieses lässt sich bei der Verwendung eines Lasers sehr genau fokussieren und dosieren. Damit ist die PDT einer klassischen Chemotherapie mit Zytostatika, bei der sämtliche sich schnell teilenden Zellarten ebenfalls geschädigt werden, oder einer Radiotherapie mit ionisierender, hochenergetischer Strahlung (z.B. Gamma-, Röntgen- und Elektronenstrahlung) im Hinblick auf akute Nebenwirkungen und Folgeschäden häufig deutlich überlegen. Ein wichtiges Kriterium bei der PDT ist allerdings, dass hauptsächlich das zu behandelnde Gewebe durch den PS photosensibilisiert wird. Außerdem sollte der PS zügig abgebaut oder ausgeschieden werden, um eine Schädigung des Patienten bei Kontakt mit Sonnenlicht durch verbliebenen PS auszuschließen.

Für den erwünschten Zelltod durch PDT ist sowohl Apoptose, als auch Nekrose verantwortlich. Üblicherweise werden beide Mechanismen gleichzeitig angestoßen, wobei die

Gewichtung abhängig vom PS, Zelltyp, Sauerstoffversorgung und den Therapiebedingungen (z.B. Bestrahlungsdauer und -intensität) ist. Bei der Nekrose werden die Zellorganellen zerstört, die Plasmamembran wird durchlässig, die Zelle schwillt an und platzt auf, was zu einem schnellen Zelltod führt. Allerdings folgen daraus auch eine Entzündung des Gewebes und eine Abgabe von intrazellulärem Material in die Umgebung. Apoptose dagegen ist ein hochkontrollierter Prozess des Zelltodes, bei der die Organellen und die Struktur der Zelle lange erhalten bleiben, bis die Überreste der Zelle von Makrophagen phagozytiert werden, wodurch keine Entzündung entsteht. Da die bei der Nekrose ausgelöste entzündliche Reaktion des Gewebes bei schwer kranken Patienten ein ernsthaftes und lebensbedrohendes Problem darstellt, wird versucht, während der PDT das Level an Nekrose gegenüber Apoptose möglichst gering zu halten. Allerdings werden bei einem rein apoptotischen Zellverband nur die toten Zellen phagozytiert und somit besonders widerstandsfähige Krebszellen selektiert, welche sich dann wieder ausbreiten können. Bei einem nekrotischen Zellverband werden auch vitale Zellen mit abgebaut, daher ist ein gewisses Maß an Nekrose für eine effektive PDT notwendig.^[191] Der Grad an Nekrose hängt dabei z.B. vom Zelltyp und innerzellulären Lokalisation des PS ab, kann aber über die angewendete Licht-Dosis direkt gesteuert werden.^[192,193]

Viele der PS besitzen ein großes, durchkonjugiertes aromatisches System, welches für ihre optischen und photosensibilisierenden Eigenschaften eine Notwendigkeit darstellt.^[194] Dies führt jedoch häufig zu einer eher hydrophoben, planaren Struktur, welche die PS zwangsläufig wasserunlöslich macht und eine hohe Tendenz zur Agglomeration verursacht. Diese Eigenschaft ist von großem Nachteil für pharmakologisch aktive Substanzen. Schlechte Bioverfügbarkeit und -verteilung, Kompartimentierung in bestimmten Gewebearten oder Organen und lange Zirkulationszeit im Körper sind die Folgen. Daher ist es derzeit in der PDT häufig so, dass sich Patienten nach einer Behandlung lange in fensterlosen Räumen mit spezieller Beleuchtung aufhalten müssen, was eine zusätzliche Belastung darstellt.

Aus diesem Grund wird intensiv an Trägersystemen für PS geforscht, welche diese Nachteile vermindern sollen. Ziel dabei ist es, die Wasserlöslichkeit der PS zu verbessern, um ihre Bioverfügbarkeit und die selektive Anreicherung im Zielgewebe zu erhöhen. Beides kann die benötigte Dosis zur Behandlung verringern und für eine schnellere Ausscheidung des PS bzw.

dessen Abbau durch den Körper sorgen, so dass potentielle Nebenwirkungen und Nachteile der PDT als neue Therapieform ausgeräumt werden können. Ebenso lässt sich die PDT auch mit anderen Therapieformen und Medikamenten kombinieren, um die Effektivität der Behandlung zu steigern. So wurde bei zwei verschiedenen Krebszelllinien für die PDT mit einem HPMa-PS-Konjugat eine deutliche Steigerung der Effektivität in Kombination mit einem HPMa-DOX-Konjugat gezeigt, welche für beide Therapieformen einzeln nicht erreicht werden konnte.^[195] Die Effektivität konnte sogar weiter gesteigert werden, indem monoklonale Antikörper (OV-TL 16) für aktives *Targeting* an HPMa-DOX- und HPMa-Mesochlorin E6-Copolymere konjugiert wurden.^[196] Bei Nacktmäusen, die humane Ovarialkarzinome trugen, wurde durch den Antikörper eine 13-fach höhere Dosis im Tumor und entsprechend höhere therapeutische Erfolge erreicht.

2.3.1. Mechanismus der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff

Die bei der PDT verwendeten PS sind selbst keine biologisch aktiven Therapeutika. Die eigentlich aktive, toxische Spezies ist der durch die Anregung der PS mit Licht geeigneter Wellenlänge *in situ* erzeugte Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). Dabei werden Energietransferprozesse zwischen angeregtem PS und in der Umgebung vorhandenem molekularen Sauerstoff genutzt.

Als PS werden vornehmlich Farbstoffe verwendet, deren Anregungswellenlängen sich eher im langwelligen Bereich des sichtbaren Spektrums befinden. Licht dieser Wellenlängen besitzt eine deutlich höhere Eindringtiefe in menschliches Gewebe, so dass auch tiefer liegende Tumore therapiert werden können.^[197] Besonders geeignet sind PS, die bei einer Wellenlänge zwischen 650 nm und 800 nm absorbieren, da sich dort das sogenannte *diagnostische Fenster* befindet, bei dem die Eigenabsorption des Gewebes besonders gering ist.^[198] Da die PS wie ein Katalysator wirken, welcher selbst nicht verbraucht wird, lässt sich die $^1\text{O}_2$ -Dosis über die Bestrahlungsdauer regulieren.^[199,200] Schäden an Krebszellen, die durch die Anregung von PS-Molekülen erzeugt werden, finden sich meist bei den intrazellulären Membranen von Mitochondrien, Golgi-Apparat, Endosomen, Lysosomen und endoplasmatischem Retikulum (ER), wodurch im Idealfall der Zelltod ausgelöst wird.^[192]

Generell werden photodynamische Effekte in drei Kategorien (**Typ I – III**) eingeteilt.^[201] Der **Typ I** der Photosensibilisierung beschreibt die Reaktion eines PS im angeregten Triplett-

Zustand mit einem anderen Molekül, wobei Radikale generiert werden (hauptsächlich Sauerstoffradikale), welche hochreaktiv und toxisch sind (**Abbildung 8**). Hingegen wird bei **Typ II** die Anregungsenergie des PS durch eine Interkombination (engl.: *Inter System Crossing*, ISC) auf molekularen Sauerstoff übertragen, wodurch dieser von seinem Triplett-Grundzustand (T_0) in den angeregten Singulett-Zustand (S_1) springt. Der so entstandene 1O_2 wirkt hochgradig toxisch. **Typ III** beschreibt alle Prozesse ohne die Beteiligung von Sauerstoff, bei denen toxische Radikale aus Nachbarmolekülen durch photoinduzierten Elektronentransfer erzeugt werden.

Für die PDT ist der **Typ II** relevant, da er unter physiologischen Bedingungen die primäre Rolle spielt, auch wenn **Typ I** und **Typ II** in Konkurrenz zueinander stehen. Die verschiedenen Prozesse der Photosensibilisierung können anhand eines *Jablonski*-Schemas verdeutlicht werden (**Abbildung 8**), wobei der Fokus hier auf dem wichtigen **Typ II** liegt.^[198]

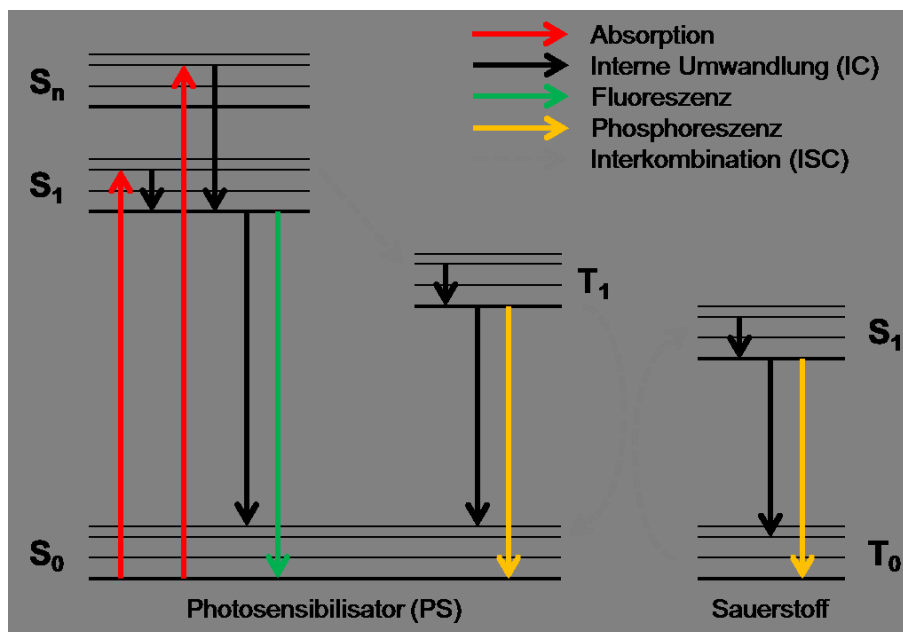


Abbildung 8. Jablonski-Schema, welches die möglichen Übergänge von Valenzelektronen in verschiedene Anregungszustände und Arten der Relaxation zeigt, hier im Hinblick auf Wechselwirkungen zwischen PS und Sauerstoff.

Der PS befindet sich zunächst im Singulett-Grundzustand (S_0), aus welchem er durch Absorption eines Lichtquants in den ersten (S_1) oder einen höheren (S_n) elektronisch angeregten Singulett-Zustand springt. Durch strahlungslose interne Umwandlung

(engl.: *Internal Conversion*, IC) relaxiert der PS in den Schwingungsgrundzustand von S_1 , aus dem er auf verschiedene Arten zum Grundzustand S_0 zurückkehren kann. Möglichkeiten dafür sind die Abgabe eines Lichtquants (Fluoreszenz) durch den PS, oder ein strahlenloser Prozess (IC). Allerdings ist es auch möglich, dass unter Spinumkehr des Valenzelektrons ein ISC stattfindet und der PS in einen angeregten Triplett-Zustand (z. B. $S_1 \rightarrow T_1$) springt. Von dort kann der PS durch Abgabe eines Lichtquants (Phosphoreszenz) oder strahlenlose IC nach S_0 relaxieren. Findet jedoch eine Stoßwechselwirkung mit in der Umgebung des PS befindlichem molekularem Sauerstoff statt, so kann der PS seine Anregungsenergie wiederum durch ISC auf diesen übertragen. Das Sauerstoffmolekül, dessen Grundzustand der Triplett-Zustand T_0 ist, wird dadurch in einen angeregten Singulett-Zustand (S_1) versetzt. So wird durch die Bestrahlung eines PS mit Licht hochreaktiver und zytotoxischer Singulett-Sauerstoff (1O_2) erzeugt. Die PS selbst relaxiert durch das ISC wieder zu seinem Grundzustand (S_0) und steht für einen weiteren Prozess der Photosensibilisierung zur Verfügung. Der 1O_2 reagiert in zellulärer Umgebung sehr schnell mit Biomolekülen und schädigt so das Gewebe. Wird der 1O_2 nicht verbraucht, so kann er durch Phosphoreszenz oder IC in seinen Triplett-Grundzustand (T_0) zurückkehren.

2.3.2. Photosensibilisatoren

Die Wirkung von Licht in Kombination mit photosensibilisierenden Substanzen als therapeutische Maßnahme erweckte um das Jahr 1900 bereits wissenschaftliches Interesse.^[202,203] Die geschichtliche Entwicklung der PS führte zu einer Einteilung in die Generationen 1 – 3. Bei der ersten Generation handelt es sich um Haematoporphyrin-Derivate (HpD), eine Mischung aus oligomeren Haematoporphyrinen. Ein sehr potenter Vertreter dieser Gruppe ist der von Dougherty *et al.* erforschte Dihaemoporphyrinether, welcher 1993 unter dem Namen Photofrin[®] als erster PS überhaupt von der FDA für die PDT zugelassen wurde. Nachteil der ersten Generation der PS war die eher schwache Absorptionsbande bei 630 nm der HpD. Somit wurde nur eine relativ schwache Reaktion der PS auf die Bestrahlung erreicht. Daher waren relativ hohe PS-Dosen und eine lange bzw. intensive Bestrahlung nötig, um eine ausreichend hohe 1O_2 -Ausbeute für die Therapie zu gewährleisten. Außerdem handelte es sich bei Photofrin[®] um ein Gemisch, welches trotz Aufreinigung noch eine große Anzahl an verschiedenen Verbindungen enthielt. Damit war die Reproduzierbarkeit bezüglich Synthese und medizinischen bzw. biochemischen Studien problematisch, was sich auf den

kommerziellen Erfolg auswirkte. Zusätzlich besaß Photofrin® die Tendenz, sich in Krebszellen und gesunden Zellen nahezu gleichermaßen stark anzureichern. Dies war besonders in der Haut der Fall, wo es vier bis sechs Wochen verblieb. Damit wurde auch gesundes Gewebe bei Lichtkontakt geschädigt und die Patienten verblieben eine lange Zeit photosensitiv nach der eigentlichen Behandlung.^[1]

Die Nachteile der HpD führten zur Entwicklung einer Vielzahl von PS mit optimierten spektroskopischen Eigenschaften, wie einem bathochrom verschobenen Absorptionsspektrum und einer höheren $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeute. Zusätzlich wurden sie der Forderung einer chemisch definierten, produktreinen Verbindung gerecht. Bei vielen PS dieser zweiten Generation handelte es sich um Phorphyrine und ihre reduzierten Derivate wie Chlorine und Bacteriochlorine.^[194] Die in dieser Arbeit verwendeten PS *m*-THPC, Chlorin E6 und Pheophorbid A gehören ebenfalls der zweiten Generation an (**Abbildung 9**). Viele PS dieser Generation befinden sich mittlerweile in der klinischen Anwendung.

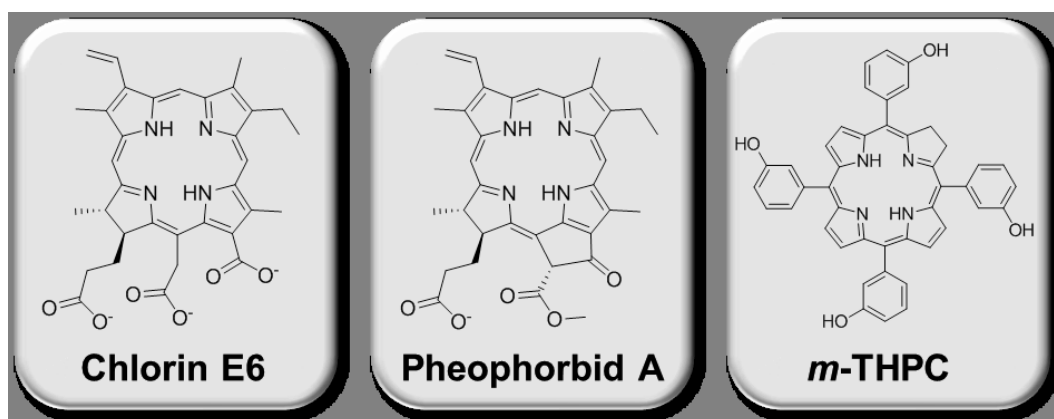


Abbildung 9. Strukturformeln dreier Vertreter der zweiten Generation von PS: Chlorin E6, Pheophorbid A und *m*-THPC, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

Die Verbesserungen der zweiten Generation beschränkten sich hauptsächlich auf chemische Reinheit und optische Eigenschaften. Die dritte Generation fokussierte sich mehr auf biologische Kriterien bzw. pharmakologische Aspekte und Tumor-Selektivität. Es handelte sich dabei weniger um neu entwickelte PS, sondern um Transporter-Systeme und Formulierungsadditive, wie Liposomen, Nanomaterialien oder Biokonjugate wie glykosylierte PS. Von diesen Ansätzen wurden sich Verbesserungen in der Löslichkeit, Aufnahme und Lokalisierung in verschiedenen Zellkompartimenten und *Targeting*-Effekte versprochen.^[204]

2.3.3. Temoporfin (Foscan®)

Temoporfin (5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)chlorin, *m*-THPC), welches unter dem Handelsnamen Foscan® vertrieben wird, ist einer der ältesten und am umfangreichsten studierten PS der zweiten Generation für PDT und Photodiagnostik (PD). Bereits sein Vorgänger, das Porphyrin-Analoga *m*-THPP, wies eine 25 – 30-fach stärkere Photosensibilisierung in Tumormodellen als HdP^[205] und hervorragende Tumorlokalisation in C3H-Mäusen^[206] auf, auch wenn dessen Absorption bei 630 nm nicht deutlich besser ist, als die von Photofrin®. *m*-THPC kann als idealer PS der zweiten Generation angesehen werden, da es chemisch rein hergestellt werden kann und eine deutlich bessere Tumor- gegen Normalgewebe-Verteilung zeigt. Außerdem besitzt es ein Absorptionsmaximum bei 652 nm, also rotverschoben im Vergleich zu HdP, wodurch das Anregungslicht tiefer in das Gewebe eindringen kann. Somit werden weniger PDT-Sitzungen, kürzere Behandlungszeiten und geringere Lichtdosen benötigt, um denselben therapeutischen Effekt zu erzielen.^[207]

Für den europäischen Markt wurde *m*-THPC von der europäischen Arzneimittel-Agentur (engl.: *European Medicines Agency*, EMA) für die palliative Behandlung bei fortgeschrittenen Kopf-Hals-Karzinomen zugelassen. Allerdings mit der Einschränkung, dass vorherige Behandlungen fehlgeschlagen und die Patienten nicht für Radiotherapie, Chirurgie oder systemische Chemotherapie geeignet sind. Trotz vielversprechendem Potential und erforderlichen klinischen Tests wurde *m*-THPC von der FDA die Zulassung verweigert. *m*-THPC wird nicht verstoffwechselt und verlässt den Körper nahezu unverändert, bis auf Spuren von bekannten Photooxidationsprodukten.^[208] In Mausmodellen wurde gezeigt, dass die maximale Konzentration an *m*-THPC im Tumor nach zwei Tagen erreicht wird. Die Ausscheidungshalbwertszeit für das Mausmodell wird auf 10-12 Tage geschätzt.^[209] Im direkten Vergleich der Pharmakokinetik zwischen Menschen und Mausmodellen wurde für den Menschen eine deutlich längere Zeit benötigt, um hohe Konzentrationen an *m*-THPC in der Blutbahn zu erzielen. Dieser Effekt wird der Bildung eines Wirkstoff-Depots im menschlichen Metabolismus zugeschrieben.^[210]

Aufgrund der Tatsache, dass *m*-THPC wasserunlöslich ist, kann es nur mittels Formulierungsadditiven verabreicht werden. Die ersten Versuche enthielten Ethanol und PEG oder Propylenglycol.^[211] Als Standardformulierung für freies *m*-THPC hat sich mittlerweile eine Mischung aus Ethanol, PEG-400 und Wasser (20 : 30 : 50 v/v) durchgesetzt. Freies

m-THPC in Lösung wird unter dem Handelsnamen Foscan[®] vertrieben, während es neuerdings zusätzlich Nanoformulierungen unter dem Namen Foslip[®] und Fospeg[®] gibt. Bei Foslip[®] wird *m*-THPC in unilamellare Vesikel eingebracht, womit es zur dritten Generation der PS gezählt wird.^[212] Bei Studien in Krebszellen (Plattenepithelkarzinom) zeigt Foslip[®] eine zwei- bis vierfach höhere Bioverfügbarkeit, eine kürzere Verteilungshalbwertszeit und eine gute Tumorselektivität im Vergleich zu freiem *m*-THPC. Bei Fospeg[®] handelt es sich ebenfalls um eine liposomale Formulierung wie Foslip[®], welche aber zusätzlich PEO-Phosphatidylethanolamin enthält.^[213,214] Somit verfügt Fospeg[®] über eine äußere PEO-Hülle, welche die Liposomen sterisch stabilisiert und gegen Blutplasmabestandteile abschirmt. Während liposomales *m*-THPC in Form von Foslip[®] durch Freisetzung des Wirkstoffs und Zerstörung der Liposomen schnell aus der Blutbahn eliminiert wurde, zeigte Fospeg[®] eine signifikante Menge an zirkulierendem *m*-THPC für bis zu sechs Stunden, wobei die Liposomen intakt blieben.^[215,216]

Das hohe Potential von *m*-THPC als Photosensibilisator für die photodynamische Therapie, bei gleichzeitig großen Einschränkungen bezüglich Zulassung und Anwendung als Medikament als direktes Resultat seiner Unlöslichkeit in Wasser und entsprechend schlechter Biodistribution, machen den Wirkstoff zu einem guten Kandidaten für die Erprobung des Konzeptes der spezifischen Löslichkeitsvermittler auf Basis von Peptid-PEO-Konjugaten. Somit wurde *m*-THPC für die Entwicklung und Etablierung des Verfahrens für die Identifikation geeigneter Peptidsequenzen für die nichtkovalente Bindung des Wirkstoffs ausgewählt. Konjugiert an einen wasserlöslichen PEO-Block, sollten die so gewonnenen Peptid-PEO-Konjugate auf ihre Eignung als Löslichkeitsvermittler und Wirkstofftransporter für den Photosensibilisator untersucht werden.

3. Ergebnisse

Es konnte bereits erfolgreich gezeigt werden, dass Peptid-PEO-Konjugate in der Lage sind, wasserunlösliche niedermolekulare Wirkstoffe über nichtkovalente Wechselwirkungen mit deren Peptidsegment zu binden und durch die hohe Hydrophilie des PEO-Blocks in Lösungen zu bringen.^[162] Dennoch konnten mit dem verwendeten Konzept des empirischen Designs von bindenden Aminosäuresequenzen nicht alle der getesteten Wirkstoffe erfolgreich solubilisiert werden. Somit war das Ziel, ein *Screening*-Verfahren zu entwickeln, bei welchem niedermolekulare Wirkstoffe gegen eine möglichst große Peptidbibliothek getestet werden sollten. Damit sollten Aminosäuresequenzen selektiert werden können, welche eine hohe Bindungsaffinität zum Zielmolekül besitzen.

3.1. Entwicklung des *Screening*-Verfahrens

Ziel der Arbeit war es, ein *Screening*-Verfahren für die Identifikation von Aminosäuresequenzen zu etablieren, welche konjugiert an einen PEO-Block als spezifische Solubilisatoren dienen sollten. Die Bindung sollte dabei ausschließlich auf nichtkovalenten Wechselwirkungen wie van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, π - π -Wechselwirkungen usw. zwischen den Aminosäureseitenketten bzw. den Amidbindungen des Peptidrückgrats und dem Zielmolekül beruhen. Dabei wurde angestrebt, dass das Peptid komplementäre Eigenschaften bezüglich Struktur und Funktionalitäten zu denen des Zielmoleküls besitzen sollte, um eine möglichst spezifische Bindung zu verwirklichen. Idealerweise sollte bei dem *Screening* auf die chemische Modifikation des Wirkstoffs, wie die Immobilisierung an einem festen Träger oder das Anbringen einer Markierung (engl.: *Label*), verzichtet werden, um nicht ungewollt die Eigenschaften des Zielmoleküls zu beeinflussen. Außerdem besteht bei der Markierung des Zielmoleküls die Gefahr, dass im *Screening* nach passenden Bindern Strukturen selektiert werden, welche die Markierung binden und nicht das eigentliche Zielmolekül. Des Weiteren sollte besonders im Fall von bereits zugelassenen Wirkstoffen auf eine chemische Modifikation verzichtet werden, da im Hinblick auf die klinische Anwendung sonst eine komplett neue Zulassung und nicht nur die Zulassung eines Formulierungsadditives notwendig werden würde. Dass die niedermolekularen Wirkstoffe nicht chemisch modifiziert werden sollten, schließt auch biokombinatorische Methoden, wie z.B. das Phagen-Display,^[217] aus, da in diesem Fall meistens das Zielmolekül an einem festen Trägermaterial

immobilisiert wird, um positive Treffer aus der Phagenbibliothek zu isolieren. Zusätzlich werden für Phagen-Display Laboratorien mit mikrobiologischer Ausrichtung und der damit verbundenen technischen Ausstattung benötigt, welche in gängigen organisch-chemischen Laboratorien üblicherweise nicht zur Verfügung steht.

Aus diesem Grund wurden für die Etablierung des Systems im Rahmen dieser Arbeit Zielmoleküle gewählt, die eine intrinsische Fluoreszenz besitzen und daher fluoreszenzmikroskopisch verfolgt werden können. Für die erste Entwicklung der Methodik wurde als Zielmolekül der bereits beschriebene Photosensibilisator *m*-THPC verwendet. Dieser entspricht den oben definierten Vorgaben, da es sich dabei um ein Farbstoffmolekül handelt, welches durch Anregung bei diversen Wellenlängen Fluoreszenz bei ca. 655 nm emittiert. Außerdem besitzt es eine sehr hydrophobe, aromatische und scheibenförmige Struktur mit einer hohen Tendenz zur Aggregation, was *m*-THPC äußerst wasserunlöslich macht. Diese Eigenschaft sorgt für zahlreiche Probleme bei der Anwendung und Zulassung des ansonsten sehr vielversprechenden Kandidaten für die photodynamische Krebstherapie. Somit bot es sich als gute Testsubstanz für die Entwicklung spezifischer Solubilisatoren an.

Mit Hilfe der über das *Screening*-Verfahren gewonnen Informationen sollten im Anschluss geeignete Löslichkeitsvermittler (Solubilisatoren) für die jeweiligen niedermolekularen Wirkstoffe entwickelt werden. Dafür wurden über das Verfahren gefundene wiederkehrende Bindungsmotive bzw. komplette Sequenzen an einen PEO-Block konjugiert. Somit sollte die nichtkovalente Bindung des Gastmoleküls über den Peptid-Block des Biokonjugates vermittelt werden. Der Polyethylenoxid-Block (PEO) des Konjugats hingegen sollte dem System eine ausreichende Wasserlöslichkeit verleihen, um das Peptid mitsamt unlöslichem Wirkstoff in wässrige Lösung zu überführen.

3.1.1. Konzept des *Screening*-Verfahrens

Da das Zielmolekül *m*-THPC frei und unmodifiziert vorliegen sollte, lag es nahe, im Gegenzug die zu testende Peptidbibliothek an einem festen Träger zu immobilisieren, da so identifizierte positive Treffer leicht entfernt und analysiert werden können. Um den aufgezählten Anforderungen zu entsprechen, fiel die Wahl auf die Adaptierung der bereits erwähnten kombinatorischen Peptidsynthese nach dem *Split&Mix*-Verfahren.^[218] Dabei wird ein breiter Sequenzraum an randomisierten Peptiden erzeugt, wobei jedoch jedes einzelne

Harzkügelchen nur zahlreiche Kopien derselben Sequenz an ihrer Oberfläche trägt (engl.: *One-Bead-One-Compound*, OBOC).

Die *Split&Mix*-Synthese wurde 1991 von Fruka *et al.* vorgestellt und ist eine Methode der kombinatorischen Chemie, mit der festphasengebundene Peptidbibliotheken hergestellt werden können.^[219] Sie ist eine Abwandlung der klassischen SPPS nach Merrifield, bei der eine definierte Peptidsequenz durch schrittweise Verknüpfung einzelner Aminosäurebausteine an einem festen Trägerharz aufgebaut werden.

Die *Split&Mix*-Synthese ist bezüglich der Immobilisierung an einer festen Phase, des Schutzgruppenkonzeptes und der einzelnen Arbeitsschritte wie Entschützungs-, Wasch- und Kupplungsschritten identisch mit der Festphasenpeptidsynthese. Um allerdings nicht nur ein Peptid, sondern eine Peptidbibliothek mit einer Vielzahl unterschiedlicher Aminosäuresequenzen zu erzeugen, wird das Prinzip der kombinatorischen Chemie angewendet, vor der Kupplung eines Aminosäurebausteins das Festphasenharz in mehrere Teilmengen aufzuteilen (**Abbildung 10**). Jede dieser Teilmengen wird anschließend mit einer anderen Aminosäure zur Reaktion gebracht, um im nachfolgenden Schritt der Entschätzung wieder vereint und vermischt zu werden.

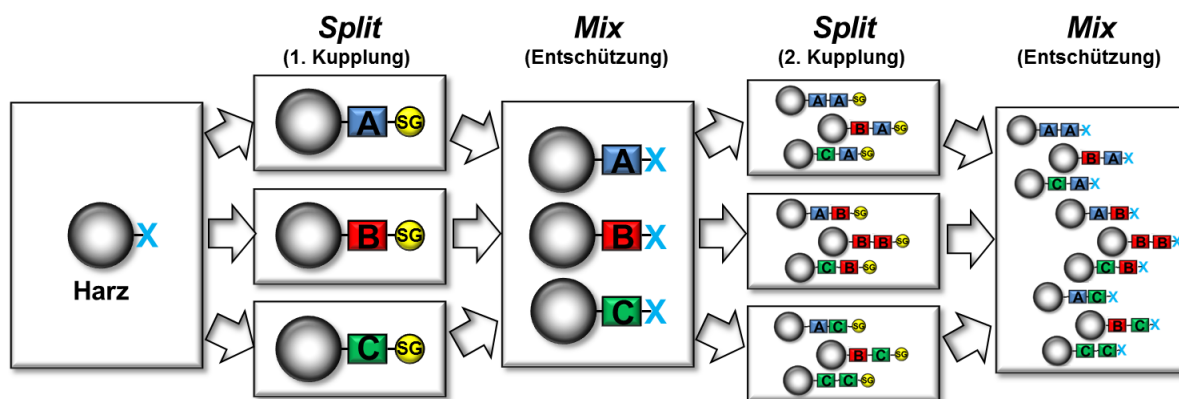


Abbildung 10. Schematische Darstellung einer Festphasenpeptidsynthese nach dem *Split&Mix*-Prinzip (A-C: Aminosäure-Bausteine, SG: Schutzgruppe, X: freie Funktionalität für Kupplung).

Durch das wiederholte Aufteilen und Kuppeln verschiedener Bausteine und nachfolgender Vermischung aller Harzpartikel wird so ein großer Sequenzraum unterschiedlicher Peptidsequenzen erzeugt. Da allerdings das Peptidmaterial immobilisiert ist und jeder Harzpartikel jeweils nur einer bestimmten Reihenfolge an Reaktionen ausgesetzt war, finden sich auf der Oberfläche jedes Partikels nur Kopien derselben Aminosäuresequenz. Die

Bibliothek kann also in der noch immobilisierten Form für das *Screening* gegen ein gewünschtes Zielmolekül eingesetzt werden.

Die so erhaltene, an einem festen Trägermaterial immobilisierte Peptidbibliothek kann nun mit einem Wirkstoff inkubiert werden (**Abbildung 11**). Trägt ein Harzpartikel dabei eine Aminosäuresequenz, welche eine hohe Bindungsaffinität dem Wirkstoff gegenüber besitzt, so reichert dieser sich an dem entsprechenden Partikel an. Die als gute Binder identifizierten Harzkügelchen werden anschließend manuell isoliert, das Peptidmaterial von den einzelnen Partikeln abgespalten und die entsprechende, gut bindende Aminosäurekombination sequenziert. Die so erhaltenen Peptidsequenzen können nun für die Synthese von spezifischen Löslichkeitsvermittlern für den Wirkstoff in Form von Peptid-PEO-Konjugaten genutzt werden. Für die Etablierung des *Screening*-Verfahrens wurde der Photosensibilisator Temoporfin (Foscan[®], *m*-THPC, vgl. Kapitel 2.3.3) ausgewählt, da er einen hochpotenten Wirkstoff für die photodynamische Krebstherapie darstellt, aber aufgrund schlechter Wasserlöslichkeit nur eine sehr eingeschränkte Anwendbarkeit und Zulassung besitzt.

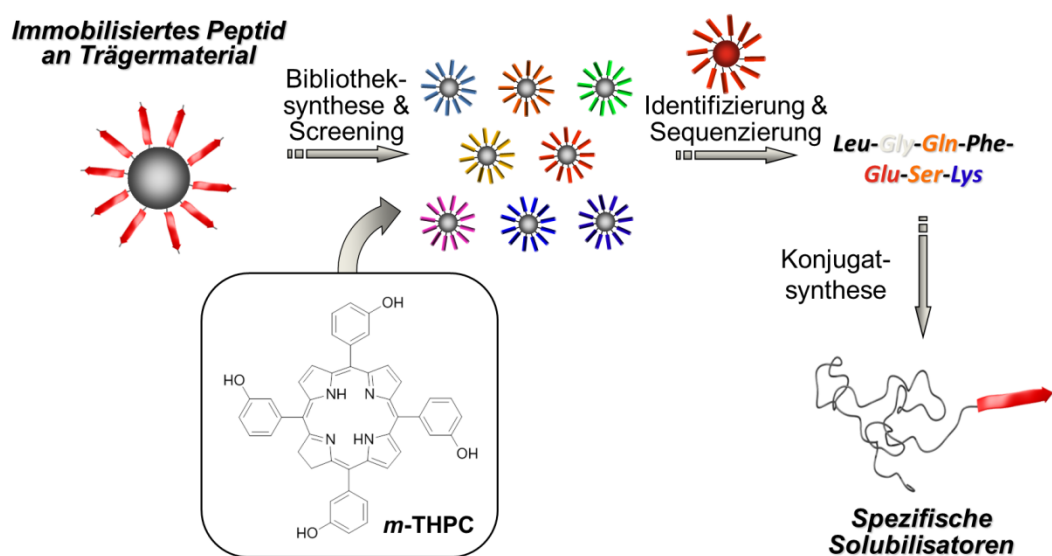


Abbildung 11. Schematische Darstellung des *Screening*-Verfahrens zur Entwicklung von Peptid-PEO-Konjugaten als spezifische Solubilisatoren. Ausgehend von der Bibliotheksynthese, dem *Screening* der immobilisierten Peptide gegen die niedermolekulare Verbindung (*m*-THPC), gefolgt von der Identifizierung und Sequenzierung von positiven Treffern. Die gefundenen Sequenzen sollten schlussendlich für die Synthese von Peptid-PEO-Konjugaten genutzt werden können.

3.1.2. Design der Peptidbibliothek

Vor der Herstellung der Peptidbibliothek nach dem Prinzip der *Split&Mix*-Synthese musste zunächst ein geeignetes Träger-Harz identifiziert werden. Dieses musste unter anderem kompatibel zu den Bedingungen der festphasengebundenen Peptidsynthese nach der Fmoc-Strategie sein. Dazu gehört ein gutes Quellverhalten in organischen Lösemitteln wie *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) und Dichlormethan (DCM), sowie Beständigkeit unter stark sauren (Trifluoressigsäure, TFA) und basischen (Piperidin) Bedingungen. Weiterhin ist eine ausreichend hohe Funktionalisierung der Oberfläche für die Peptidsynthese notwendig. Auf der anderen Seite muss das Harz kompatibel zu den wässrigen Bedingungen des *Screening*-Verfahrens sein und eine möglichst geringe unspezifische Wechselwirkung des Polymer-Harzes mit dem entsprechenden Wirkstoff garantieren. Daher war die Nutzung der bei der Festphasen-Peptidsynthese üblicherweise verwendeten Harze auf Polystyrol-Basis ausgeschlossen. Polystyrolharze schrumpfen stark in Wasser und ihre aromatische Struktur würde zu starken unspezifischen Wechselwirkungen mit *m*-THPC führen. Als ein geeignetes Harz erwies sich Aminomethyl-Chemmatrix[®] [54,57,220,221]. Dies ist ein aus PEO bestehendes Amino-funktionalisiertes Festphasenharz, welches über Vinylgruppen kreuzvernetzt ist (**Abbildung 12**). Da es ausschließlich aus primären Ether-Bindungen aufgebaut ist, ist es inert und ausreichend stabil gegenüber den chemischen und mechanischen Belastungen der Synthese und des *Screenings*. Die amphiphile Natur der PEO-Ketten sorgt für ein außerordentlich gutes Quellverhalten in den unterschiedlichsten Lösemitteln. In wässrigem Medium zeigten die aufgequollenen Harzkügelchen einen durchschnittlichen Durchmesser von rund 200 µm, was die Separation von einzelnen Partikeln mittels einer Mikropipette zulässt.

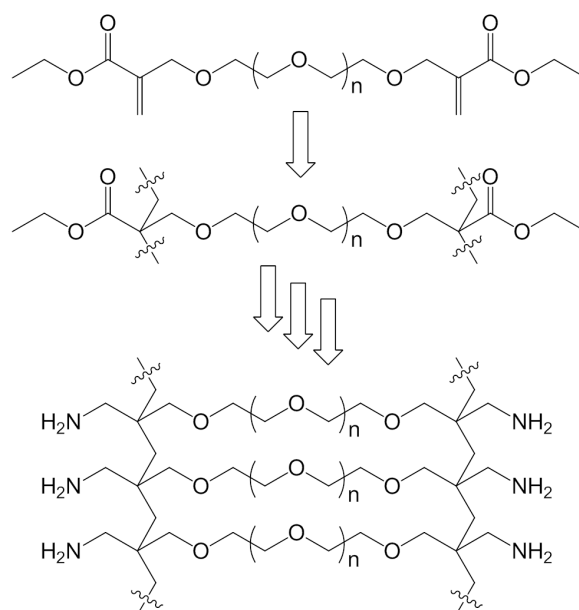


Abbildung 12. Struktur des genutzten Aminomethyl-Chemmatix®-Harzes: Polymerisation von endgruppenfunktionalisiertem PEO zum kreuzvernetzten Harz mit anschließender Umfunktionalisierung der Endgruppen zu primären Aminen.

Nach der Identifikation eines geeigneten Trägermaterials sollte anschließend der Aufbau der eigentlichen Peptidbibliothek erarbeitet werden. Die Bibliothek sollte aus randomisierten 7mer-Peptiden bestehen, welche an jeder Position der Sequenz sieben unterschiedliche Aminosäuren tragen konnten (**Abbildung 13A**). Die sieben für die Bibliothek verwendeten Aminosäuren wurden dabei so aus den 20 kanonischen Aminosäuren gewählt, dass sie ein möglichst breites Spektrum an chemischen Eigenschaften abdecken (**Abbildung 13B**). Es wurde hydrophob-aliphatisches Leucin, hydrophob-aromatisches Phenylalanin, polar-neutrales Serin, anionisches Lysin, kationische Glutaminsäure, das Carbonsäureamid Glutamin, sowie Glycin als flexibler Vertreter ohne Seitenkette gewählt. Damit enthielt die Bibliothek theoretisch rund 823.000 verschiedene Aminosäuresequenzen, aus welchen gute Binder für *m*-THPC selektiert werden sollten. Die Größe des Ansatzes wurde dabei so gewählt, dass die Anzahl der Harzpartikel ausreicht, damit jede theoretisch mögliche Aminosäuresequenz mindestens einmal in der Bibliothek enthalten sein kann (vgl. Kapitel 6.2).

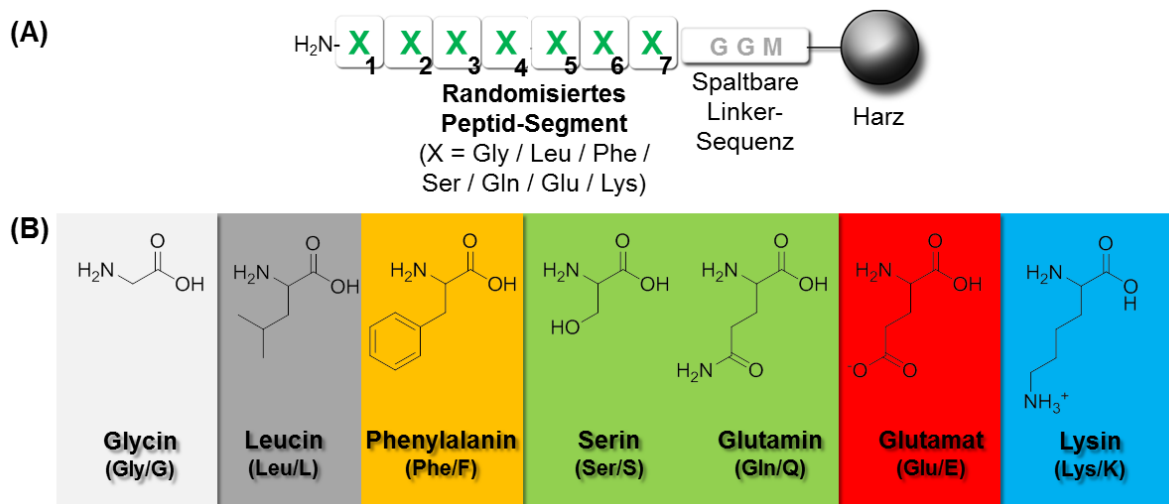


Abbildung 13. (A) Aufbau der immobilisierten Aminosäuresequenzen der Peptidbibliothek. **(B)** Strukturformeln der verwendeten sieben kanonischen Aminosäuren.

Für die Synthese der randomisierten Peptidsequenzen wurde das Harz vor jedem Kupplungszyklus in sieben Aliquote unterteilt und jeweils eine der sieben Aminosäuren in den verschiedenen Reaktoren gekuppelt. Für die Waschschritte und die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe am primären Amin des *N*-Terminus wurden die Harzportionen wieder in einem großen Reaktor vereint, durchmischt und für den darauffolgenden Kupplungsschritt wieder aufgeteilt. Dieser Vorgang wurde siebenmal wiederholt, um die angestrebte 7mer Peptidbibliothek zu erhalten.

Mit dem Ziel, im Anschluss an das *Screening* der Peptidbibliothek die Möglichkeit zu haben, die selektierten Peptide vom festen Trägermaterial abzuspalten und charakterisieren zu können, musste eine spaltbare Gruppe zwischen Harz und Peptid eingeführt werden. Üblicherweise wird bei der SPPS nach der Fmoc-Strategie ein säurelabiler Linker benutzt, um gleichzeitig alle Seitenkettenschutzgruppen zu entfernen und das Peptid vom Syntheseharz abzuspalten. Da aber das *Screening* an vollständig entschützten Peptiden mit freien Seitenkettenfunktionalitäten an der festen Phase durchgeführt werden sollte, wurde eine dritte orthogonale Spezies benötigt. Diese musste bei der Entfernung aller Seitenkettenschutzgruppen durch Behandlung des Harzes mit Trifluoressigsäure (engl.: *trifluoro acetic acid*, TFA) stabil bleiben. Gleiches galt für die basischen Bedingungen der Fmoc-Abspaltung während der SPPS. Im Anschluss an das *Screening* sollte sie aber gezielt spaltbar sein, um das als positive Treffer identifizierte Peptidmaterial sequenzieren zu

können. Eine gängige Methode für den nicht enzymatischen Verdau von Proteinen für die Sequenzaufklärung ist die Spaltung nach Methionin-Resten in der Aminosäuresequenz mit Bromcyan, welche erstmals von Gross *et al.* an der bovinen Pankreas-Nuklease demonstriert wurde.^[222] Diese robuste Methode wurde bereits erfolgreich auf die Abspaltung von Peptiden aus festphasengebundenen *Split&Mix*-Bibliotheken angewendet.^[223] Um die Möglichkeit der selektiven Spaltung mit Bromcyan zu nutzen, wurde daher vor der Synthese des eigentlichen, randomisierten Peptidsegments eine Linker-Sequenz aus zwei Glycin-Resten und einem C-terminalen Methionin an das Harz gekuppelt. Glycin dient dabei als Abstandhalter zwischen der Peptidbibliothek und dem später zu spaltendem Methionin. Für die Spaltung wurde eine Lösung aus Bromcyan in 0.1 M Salzsäure zu den jeweils einzelnen, selektierten Harzkügelchen gegeben. Bei der Spaltung erfolgt ein elektrophiler Angriff des Cyanokohlenstoffs am Thioether des Methionins (**Abbildung 14**). Unter Abspaltung von Methylthiocyanat entsteht ein Iminolacton-Derivat, welches anschließend hydrolysiert wird. Dabei wird das Peptid mit einem C-terminalen Homoserin-Lacton-Rest freigesetzt, während sich das primäre Amin des Aminomethyl-Chemmatrix®-Harzes zurückbilden kann. Der Fünfring des Homoserin-Lactons kann sich durch weitere Hydrolyse zum Homoserin öffnen.

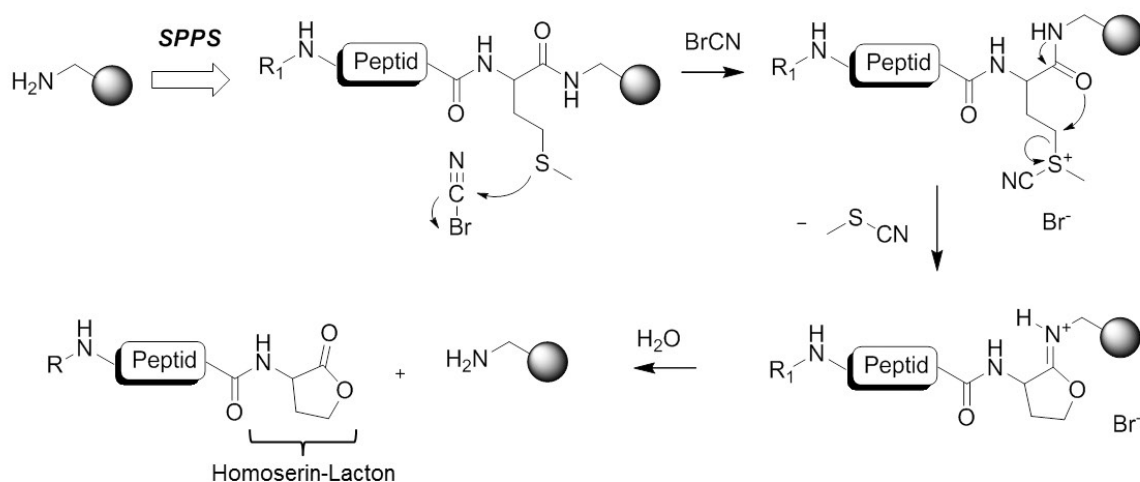


Abbildung 14. Mechanismus der Spaltung des C-terminalen Methionin-Restes mittels Bromcyan nach der Isolation positiver Treffer aus der Peptidbibliothek.

3.2. Screening von *m*-THPC gegen die Peptidbibliothek

Die über das *Split&Mix*-Verfahren synthetisierte Bibliothek konnte nun mit der ersten niedermolekularen Testsubstanz *m*-THPC inkubiert werden. Der in Wasser vollständig unlösliche Wirkstoff wurde dabei als freie, chemisch unveränderte Substanz eingesetzt. Die Anreicherung an Harzpartikeln, welche eine Peptidsequenz mit hoher Affinität gegenüber *m*-THPC tragen sollte über dessen intrinsische Fluoreszenz bei 655 nm mit einem Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden.

3.2.1. Identifikation von positiven Treffern

Die Peptidbibliothek (**Bib1**) wurde mit *m*-THPC in einer Mischung aus Wasser und Ethanol (9:1 v/v) inkubiert (vgl. Kapitel 6.3). Das Zusetzen von 10 % Ethanol sollte dabei die Löslichkeit von *m*-THPC erhöhen. Als Inkubationszeit wurden 72 h gewählt, um eine ausreichende Verteilung des Wirkstoffs in der Bibliothek zu gewährleisten. Nach mehreren Waschschritten wurden Aufnahmen der Harzkügelchen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops angefertigt (**Abbildung 15A**). Dafür wurde ein Filtersatz gewählt, welcher Licht geeigneter Wellenlängen für die Anregung von *m*-THPC, als auch dessen Fluoreszenzemission ($\lambda_{\text{Em}} = 655 \text{ nm}$), passieren lässt. Es zeigte sich eine unterschiedlich intensive Fluoreszenz-Emission an den verschiedenen Harzpartikeln. Gleichzeitig wurden als Kontrollexperimente jeweils Aufnahmen der Bibliothek ohne *m*-THPC (**Abbildung 15B**) und des reinen Chemmatrix[®]-Harzes ohne immobilisierte Peptide nach Inkubation mit *m*-THPC (**Abbildung 15C**) aufgezeichnet. Dabei zeigte sich wie erwartet, dass die Peptidbibliothek selbst keine Fluoreszenz in dem genutzten Wellenlängenbereich emittiert. Des Weiteren war keine Anreicherung des Wirkstoffs an bestimmten Partikeln zu erkennen, sobald diese keine Peptide trugen. Es war lediglich ein geringes Maß an gleichmäßiger Hintergrund-Emission durch unspezifische Wechselwirkung gegeben. Somit muss der beobachtete Effekt in einer Anreicherung des Wirkstoffs an einzelnen Partikeln der **Bib1**, hervorgerufen durch deren immobilisierte Peptidsequenzen, begründet liegen.

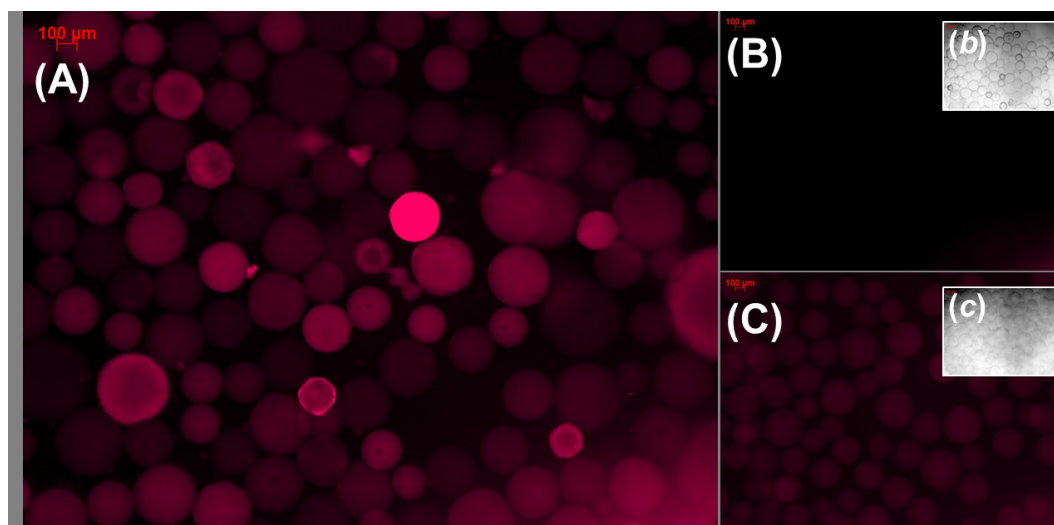


Abbildung 15. Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen des Screenings von *m*-THPC gegen die Peptidbibliothek (**Bib1**). (A) Peptidbibliothek inkubiert mit *m*-THPC, (B) Peptidbibliothek ohne *m*-THPC, (C) Chemmatrix[®]-Harz inkubiert mit *m*-THPC, (b) / (c): Jeweils Streulicht-Aufnahme des Bildausschnitts (Bedingungen: Partikelsuspension in Wasser, Anregung: 620 - 650 nm, Emission: 660 - 710 nm).

3.2.2. Sequenzierung der Treffer mittels MALDI-ToF-MS/MS

Besonders stark fluoreszierende Partikel wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe einer Mikropipette von der Bibliothek isoliert und deren Peptidmaterial zur Analyse vom festen Träger abgespalten. Dafür wurden die Partikel einzeln mit einer Lösung aus Bromcyan (20 mg/mL) in verdünnter Salzsäure (0.1 M) behandelt, gefriergetrocknet und anschließend mit Essigsäureanhydrid acetyliert, um Lysin und Glutamin in den Massenspektren unterscheiden zu können. Daraufhin wurden die Proben mittels MALDI-ToF-MS/MS-Spektrometrie analysiert, um die Aminosäuresequenzen der positiven Treffer aufzuklären.¹ Es wurden zunächst einfache MALDI-ToF-MS-Spektren der Proben gemessen und anschließend die Ionen der fünf Signale mit der höchsten relativen Intensität durch ein Kollisionsgas (hier: Luft) fragmentiert (**Abbildung 16**). Bei der Fragmentierung können Amidbindungen des analysierten Peptids vom *N*-Terminus aus jeweils vor dem Carbonylkohlenstoff (A- und X-Ionen), zwischen Carbonylkohlenstoff und Amidstickstoff

¹ Die Sequenzierungen der positiven Treffer mittels MALDI-ToF-MS/MS-Spektrometrie wurden in Kooperation mit Frau Heike Stephanowitz und Dr. Eberhard Krause des Leibniz-Instituts für molekulare Pharmakologie in Berlin-Buch durchgeführt.

(B- und Y-Ionen), oder nach dem Amidstickstoff (C- und Z-Ionen) gespalten werden. A/B/C- und X/Y/Z-Ionen bezeichnen dabei jeweils die *N*- bzw. *C*-terminalen Bruchstücke. Im Regelfall sind die B- und Y-Ionen die am häufigsten auftretenden und intensivsten Signale in MS/MS-Spektren von Peptiden oder Proteinen. Über den Vergleich der gefundenen Fragment-Ionen mit einer maßangefertigten Datenbank, die alle theoretisch möglichen Aminosäuresequenzen (8.2×10^5) enthielt, wurden schließlich die Aminosäuresequenzen der isolierten Treffer identifiziert.

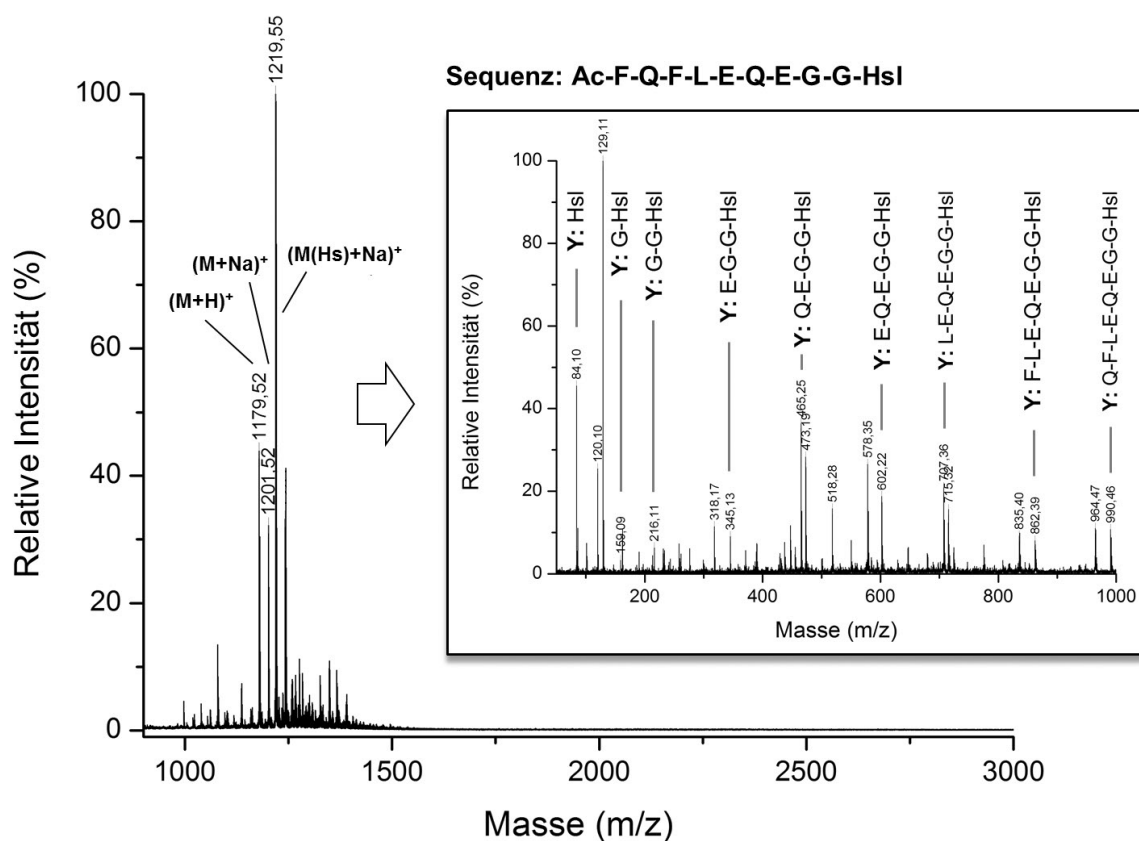


Abbildung 16. Beispiel eines MALDI-ToF-MS-Spektrums des Peptid-Rohmaterials nach der Spaltung von einem einzelnen Harzpartikel und das dazugehörige MS/MS-Spektrum (Fenster) des Produktpeaks ($m/z = 1179.52$) nach der Fragmentierung (der Übersichtlichkeit halber sind nur die Y-Ionen beschriftet; Hsl: Homoserin-Lacton, Hs: Homoserin).

Das Peptidmaterial von insgesamt 41 stark fluoreszierenden Partikeln wurde nach der gleichen Prozedur sequenziert. Der Anzahl an zu analysierenden Treffern waren hier jedoch Grenzen gesetzt, da jeder Harzpartikel manuell isoliert und das Peptidmaterial einzeln von

den Partikeln abgespalten und aufgearbeitet werden musste, bevor es massenspektrometrisch sequenziert werden konnte.

Wie zu erwarten, war Phenylalanin die Aminosäure, welche mit 33 % Anteil im Verhältnis besonders häufig gefunden wurde (**Abbildung 17A**). Ebenso wurden Leucin (18 %) und Glutamin (16 %) relativ häufig selektiert. Das häufige Auftreten von Phenylalanin und Leucin lässt sich durch die sehr hydrophobe und aromatische Struktur von *m*-THPC erklären, welche durch hydrophobe und π - π -Wechselwirkungen mit den Seitenkettenfunktionalitäten dieser Aminosäuren interagieren kann. Glutamin könnte sowohl als Wasserstoffbrücken-Donor oder -Akzeptor für die Amin- und Imin-Gruppen des Tetrapyrrols und die OH-Gruppen der äußeren Hydroxyphenyl-Substituenten von *m*-THPC wirken, oder mit umgebenden Lösemittel-Molekülen wechselwirken. Das bei pH 7 kationische Lysin ist in den Sequenzen nur zu rund 4 % zu finden, während anionische Glutaminsäure-Reste noch einen Anteil von 10 % stellen. Insgesamt scheinen damit Wasserstoffbrücken-Akzeptoren wichtiger für die Bindung von *m*-THPC zu sein, was durchaus naheliegend ist in Anbetracht der Struktur des Wirkstoffs.

Es fanden sich in den Sequenzen oft drei bis vier Phenylalanine, welche sehr häufig auch in Blöcken von zwei bis drei Aminosäure-Resten angeordnet waren (**Abbildung 17B**, vgl. Kapitel 7.2, **Tabelle 18**). Diese Phenylalanin-Blöcke umschlossen teilweise einen zentralen, hydrophoben Leucin-Rest, wodurch sich ein sehr hydrophobes, aromatisches Motiv ergibt, dass sich sehr gut für die Wechselwirkung mit *m*-THPC zu eignen schien. Ebenso fanden sich zwischen Phe-Resten gelegentlich anionische Glutaminsäure-Reste, oder eine Kombination aus Glutamin und Glutaminsäure. Möglicherweise sind diese Aminosäuren dazu in der Lage, Wasserstoffbrücken zu den Amin- und Imin-Gruppen des zentralen Tetrapyrrol-Ringes von *m*-THPC auszubilden, während die sie umgebenden Phenylalanine π - π -Wechselwirkungen zum aromatischen Grundgerüst eingehen. Die aromatischen Phenylalanin-Reste wurden dabei häufig von polar ungeladenen Aminosäuren wie Glutamin oder Serin flankiert, welche wohlmöglich mit den äußeren OH-Gruppen von *m*-THPC oder dem umgebenden Lösemittel interagieren.

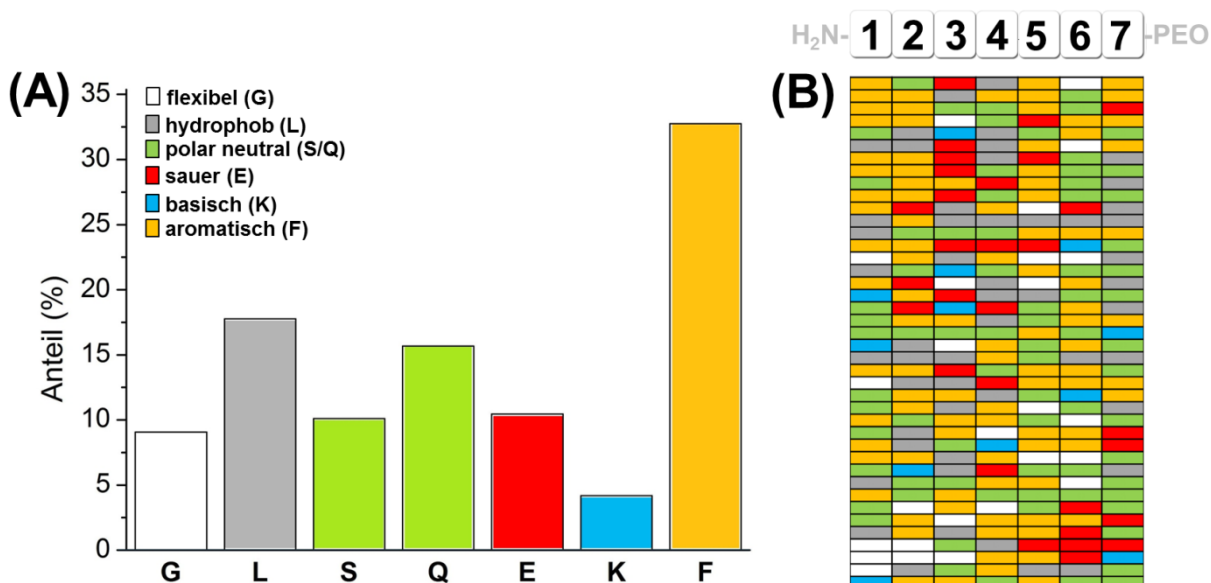


Abbildung 17. Häufigkeit der gefunden Aminosäuren insgesamt in allen sequenzierten Treffern des Screenings von *m*-THPC gegen die Peptidbibliothek **Bib1**.

3.2.3. Synthese von Peptid-PEO-Konjugaten

Diese Erkenntnisse der Sequenzierung von Treffern des Screenings der **Bib1** gegen *m*-THPC wurden daraufhin in drei Aminosäuresequenzen zusammengefasst, welche als Peptid-PEO-Konjugate synthetisiert wurden (**PI - PIII**, **Abbildung 18**). Nun sollte die Eignung dieser Konjugate, als Löslichkeitsvermittler für *m*-THPC zu wirken, getestet werden. Die Sequenzen von **PI** und **PII** wurden dabei so gestaltet, dass sie die im *Screening* gefundenen Trends gut widerspiegeln. Dabei besaßen die Konjugate sehr ähnliche Aminosäuresequenzen. Beide setzten sich aus einem Block aus vier Phenylalaninen (Axx_{2/3} und Axx_{5/6}) zusammen, welcher *N*- und *C*-terminal von einem polaren Glutamin-Rest (Axx₁ und Axx₇) eingeschlossen war. Der einzige Unterschied bestand in der zentralen Position Axx₄. Bei **PI** wurde diese mit der negativ geladenen Glutaminsäure besetzt, während sich bei **PII** an dieser Stelle ein hydrophobes Leucin befindet. **PIII** hingegen trug eine Sequenz, die direkt im *Screening* gefundene Aminosäuresequenz wurde. Sie setzte sich aus drei Phenylalaninen (Axx_{1/2/5}), einem zentralen Glutamat- (Axx₃) und Glutamin-Rest (Axx₄) zusammen, gefolgt von einem *C*-terminalen, polar-neutralen Block aus Glutamin (Axx₆) und Serin (Axx₇). Die Konjugate wurden dabei nach einer inversen Konjugationsstrategie unter Zuhilfenahme eines mit einem PEO-Block ($M_n = 3.2 \times 10^3$ g/mol) vorbeladenen PAP-

Harz (engl.: *PEG attached peptide*) mittels Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie synthetisiert.

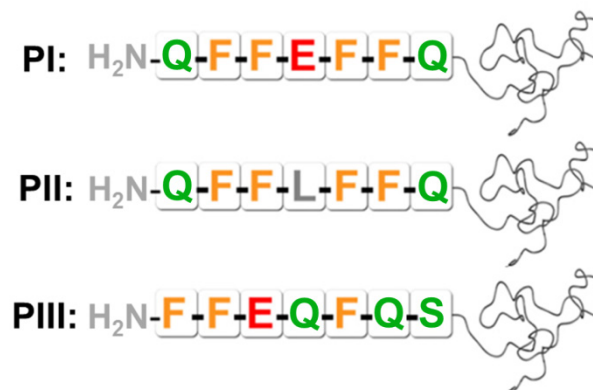


Abbildung 18. Aminosäuresequenzen der synthetisierten Peptid-PEO-Konjugate **PI – PIIL**.

3.3. Solubilisierung von *m*-THPC

3.3.1. Beladung der Konjugate

Konzeptionell sollten die gefundenen Peptidsequenzen in der Lage sein, *m*-THPC nichtkovalent zu binden, während der PEO-Block für die Wasserlöslichkeit des gesamten Komplexes sorgt. Daher wurden nun die Konjugate zunächst auf ihre Fähigkeit untersucht, das äußerst wasserunlösliche *m*-THPC in wässriger Lösung zu halten. Dafür wurde jeweils eine Lösung von *m*-THPC (1 g/L, 1.47 mM) in Ethanol mit einer Lösung der jeweiligen Konjugate in Wasser (1.47 mM, pH 7.0) vermischt und nach einer Stunde Inkubationszeit gefriergetrocknet. Die Rückstände wurden anschließend in Wasser resuspendiert und überschüssiges, nichtgebundenes *m*-THPC durch Zentrifugation abgetrennt. Von den erhaltenen Überständen wurden UV/Vis-Absorptionsspektren gemessen (**Abbildung 19**). Die Beladungsexperimente zeigten, dass alle drei Konjugate (**PI - PIIL**) in der Lage waren, *m*-THPC effektiv in Wasser zu lösen, da das typische Absorptionsspektrum des Photosensibilisators bei den Überständen zu messen war. Zusätzlich wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt. Zum einen wurde *m*-THPC demselben experimentellen Prozedere unterzogen, aber ohne Löslichkeitsvermittler. Zum anderen wurde

unfunktionalisiertes PEO ohne Peptidsegment eingesetzt. Im Vergleich der absorptionsspektroskopischen Messungen war klar zu erkennen, dass kein *m*-THPC ohne Solubilisator in wässriger Lösung verblieb und dass die Peptidsegmente der Konjugate zwingend erforderlich waren, um den Wirkstoff zu binden.

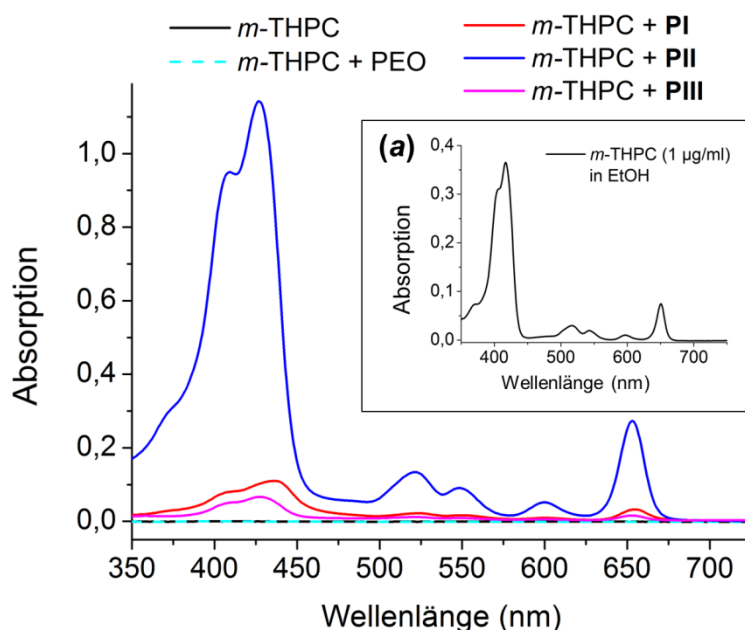


Abbildung 19. UV/Vis-Absorptionsspektren von *m*-THPC in Wasser, welches mit Hilfe der Peptid-PEO-Konjugate **PI-PIII** solubilisiert wurde, sowie Kontrollexperimente ohne Solubilisator (schwarz) und mit unfunktionalisiertem PEO (2.0×10^2 g/mol, türkis), **(a)** *m*-THPC gelöst in Ethanol (Bedingungen: Konjugate/PEO: 15 µmol/L, Raumtemperatur, pH 7).

Für die Bestimmung der tatsächlichen Konzentration an solubilisiertem *m*-THPC wurde die Absorption der erhaltenen Überstände bei 650 nm mit einer Kalibrationsgerade von freiem *m*-THPC definierter Konzentration in Ethanol verglichen. Da die Komplexierung oder Aggregation von *m*-THPC in Wasser zu einer Verbreiterung und Stauchung, sowie einer bathochromen Verschiebung der Absorptionsbanden führte, wurden die Proben für die Bestimmung der Konzentration zunächst in Ethanol verdünnt. Der Effekt der bathochromen Verschiebung und Verringerung der Absorption durch Aggregation von *m*-THPC in wässriger Umgebung ist bereits literaturbekannt. Dieser Effekt ist besonders ausgeprägt für die Soret-Bande bei 427 nm und wird der Anordnung der Farbstoffmoleküle in J-Aggregaten zugesprochen.^[224,225] Bei dem durch die Verdünnung erhaltenen Verhältnis von Ethanol zu

Wasser (99 : 1 v/v) ist *m*-THPC vollständig löslich, so dass es monomolekular vorliegt und Dimerisierung und Aggregation keinen Einfluss auf die Absorptionsspektren hat.

Bezüglich des maximalen Beladungsgrades der Konjugate **PI - III** waren signifikante Unterschiede festzustellen (**Tabelle 1**). Das Konjugat **PII**, welches einen zentralen, hydrophob-aliphatischen Leucin-Rest in seiner Sequenz trägt, erreichte mit Abstand die höchste Konzentration an *m*-THPC in wässriger Lösung. Es wurden rund 0.31 mmol *m*-THPC pro mmol Konjugat (Verhältnis 1 : 3.3 von *m*-THPC zu **PII**) erfolgreich solubilisiert. **PI** hingegen, welches sich nur durch die Substitution des zentralen Leucins durch eine negativ geladene Glutaminsäure von **PII** unterscheidet, war lediglich in der Lage, 0.06 mmol pro mmol Konjugat zu lösen (Verhältnis 1 : 17 von *m*-THPC zu **PI**). Auch **PIII**, welches ebenfalls eine geladene Glutaminsäure im Zentrum der Sequenz besitzt, aber statt eines Phenylalanins eine weitere polar-neutrale Aminosäure (Gln) mehr, löste nur 0.02 mmol pro mmol Konjugat (Verhältnis 1 : 40 von *m*-THPC zu **PIII**). Bezüglich der maximalen Aufnahmekapazität scheint somit ein rein hydrophober und aromatischer zentraler Block von Vorteil zu sein.

Tabelle 1: Beladungsgrad der Konjugate **PI – PIII** mit *m*-THPC, sowie Kontrollexperimente ohne Transporter und mit unfunktionalisiertem PEO (n.d. = nicht detektierbar).

Peptid-Polymer-Konjugat	Konzentration <i>m</i> -THPC [mmol/mmol Konjugat]	Verhältnis <i>m</i> -THPC / Konjugat
Wasser	n.d.	-
PEO-2000	n.d.	-
PI	0.06	1 : 17
PII	0.31	1 : 3.3
PIII	0.02	1 : 40

3.3.2. Bindungsstudien von *m*-THPC und Peptid-PEO-Konjugaten

Die selektierten Peptide und die signifikant unterschiedlichen Beladungsgrade, die bei der Solubilisierung von *m*-THPC erreicht wurden, lieferten Informationen über die notwendigen Funktionalitäten, um *m*-THPC effektiv nichtkovalent zu binden. Allerdings war es wünschenswert, einen tieferen Einblick in die Wechselwirkung einzelner Aminosäuren in

jeder Sequenz und den verschiedenen Funktionalitäten des Photosensibilisators zu erhalten, um gezielte Schlüsse ziehen zu können, welche Anforderungen *m*-THPC auf molekularer Ebene an einen Bindungspartner stellt. Um also die Abhängigkeit der Effektivität der Bindung von der Peptidsequenz besser zu verstehen, wurden *in silico* Bindungsstudien durchgeführt.² Dafür wurden dreidimensionale Modelle der Peptidsegmente der drei Konjugate **PI** – **PIII** (unter Vernachlässigung des PEO-Blocks) in der Software *CORINA* erstellt.^[226] Diese wurden manuell an die Struktur von *m*-THPC angedockt. Die Energie der Komplexe wurde anschließend mit Hilfe der MAB-Kraftfeld-Methode des Software-Pakets *MOLOC*^[227] minimiert, wobei die Koordinaten von *m*-THPC fixiert blieben (**Abbildung 20**). Die Abbildungen selbst wurden in *PYMOL* erzeugt. Die Analyse der nichtkovalenten Bindung zwischen Peptiden und Gastmolekül zeigte, dass π - π -Wechselwirkungen die Haupttriebkraft für die Bindung zwischen Gast- und Wirtsmolekül zu sein schien. Sie konnten zwischen den zahlreichen Phenylalanin-Resten und dem aromatischen Chlorin-Grundgerüst bzw. den äußeren Hydroxyphenyl-Substituenten von *m*-THPC gefunden werden. Des Weiteren konnten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den C- bzw. N-terminalen Glutamin-Resten und den phenolischen, äußeren Substituenten festgestellt werden (**PI** und **PII**). In Anbetracht der Sequenz von **PI** war davon auszugehen, dass der zentrale Glutaminsäure-Rest Wasserstoffbrückenbindungen zu zentralen Amin- oder Imin-Gruppen des Tetrapyrrol-Ringes von *m*-THPC formt. Allerdings bildete in den Modellen die Glutaminsäure ebenfalls H-Brücken zu einem der Phenol-Substituenten aus. Auch im Fall von **PIII** scheint es energetisch von Vorteil zu sein, dass die zentralen Glu-Gln-Reste mit OH-Gruppen der Substituenten wechselwirken. Daher war bei **PIII** auch eine Faltung des Peptid-Rückgrats zu beobachten, um diese Wechselwirkungen zu ermöglichen. **PI** und **PII** hingegen nahmen beide insgesamt eine nahezu lineare Konformation ein und passten sich damit in eine der Vertiefungen zwischen den äußeren Substituenten der sonst scheibenartigen Struktur von *m*-THPC ein.

² *In silico* Bindungsstudien der Peptidsegmente der Konjugate **PI** – **PIII** mit einer C-terminalen EO-Einheit wurden von Tiziana Masini und Prof. Dr. Anna K. H. Hirsch der Rijksuniversiteit Groningen (NL) durchgeführt.

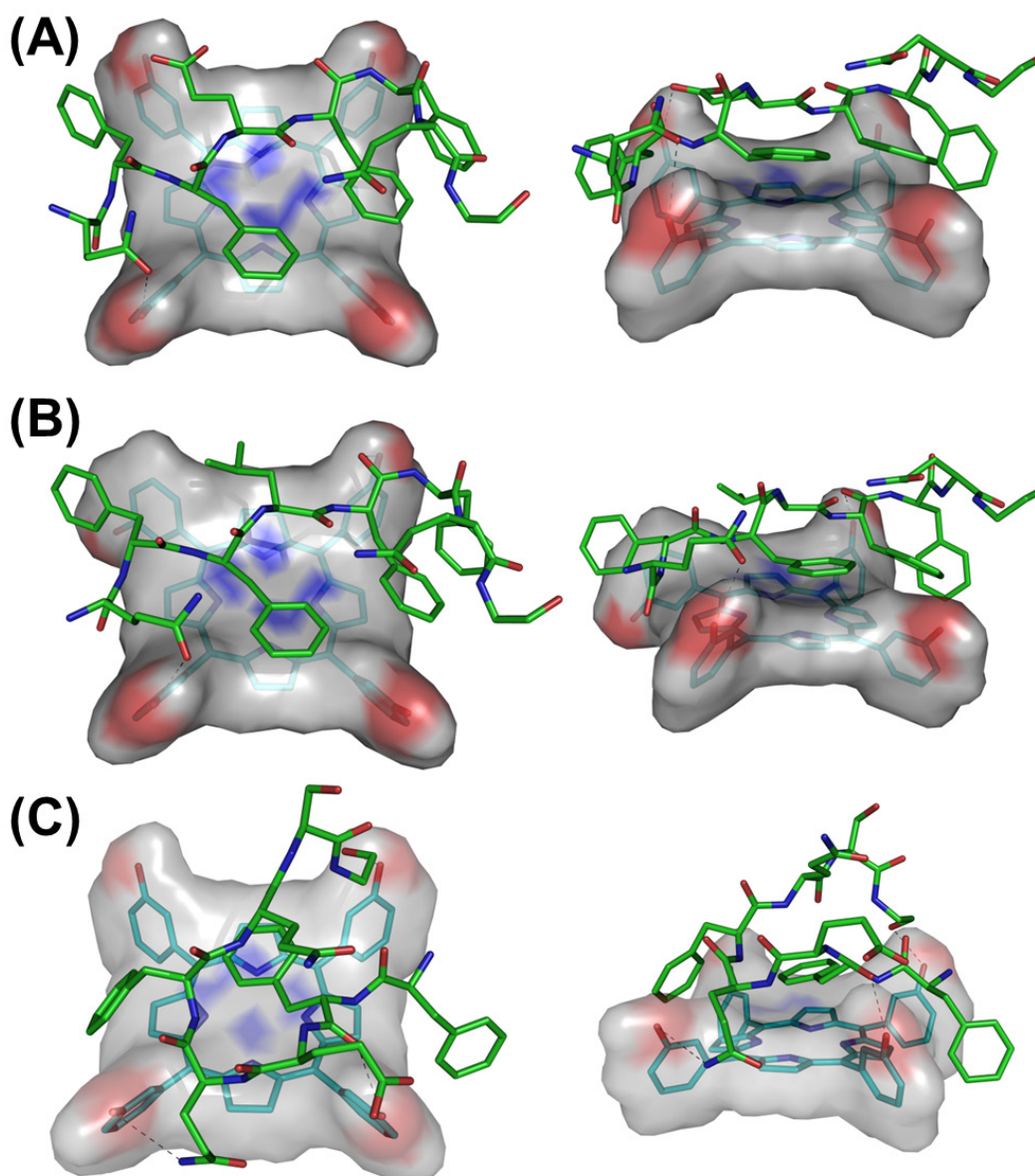


Abbildung 20. Bindungsstudien der idealisierten 1:1 Komplexe von *m*-THPC (als *van-der-Waals*-Oberfläche dargestellt) und den Peptidsegmenten (als blaues Stabmodell dargestellt) der Biokonjugat-Solubilisatoren: (A) PI / *m*-THPC, (B) PII / *m*-THPC, (C) PIII / *m*-THPC in Draufsicht (links) und Seitenansicht (rechts).

Auch wenn diese Strukturen interessante Einblicke in die Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Peptiden gewähren, so muss bedacht werden, dass es sich bei den Simulationen lediglich um Modelle handelt. Es ist unwahrscheinlich, dass die hier dargestellten idealisierten 1:1-Komplexe genau in dieser Form in der Realität auftreten werden, insbesondere, da bei der Solubilisierung im Verhältnis mehrere Konjugat-Moleküle benötigt wurden, um ein Molekül *m*-THPC in Lösung zu halten. Nichtsdestotrotz lassen sich aus diesen Modellen

Bindungsmotive ableiten, welche auch in der tatsächlichen Wechselwirkung zwischen Gast- und Peptid-Molekül eine Rolle spielen könnten. Auch bestätigt sich in den Bindungsstudien der Trend aus den Beladungsexperimenten, dass **PIII** durch sein verformtes Rückgrat weniger gut geeignet ist, um *m*-THPC effektiv zu binden.

3.3.3. Strukturaufklärung mittels dynamischer Lichtstreuung³

Neben der Solubilisierung des Wirkstoffs mit Hilfe der Peptid-PEO-Konjugate war vor allem dessen Aktivität in der solubilisierten Form von Interesse, gerade im Hinblick auf die Anwendung der Photosensibilisatoren für die photodynamische Therapie. Die Aktivität von *m*-THPC, also die Erzeugung von toxischem Singulett-Sauerstoff aus umgebenden molekularem Sauerstoff, korreliert mit seiner Fluoreszenz-Emission bei 655 nm.^[228] Daher wurden zunächst Fluoreszenzspektren des solubilisierten Wirkstoffs in Wasser gemessen. Interessanterweise konnte bei allen drei *m*-THPC/Konjugat-Komplexen, welche jeweils ihre maximale Beladung an *m*-THPC trugen, nur sehr geringe bis keine Fluoreszenzemission von *m*-THPC bei 655 nm festgestellt werden. Diese Tatsache ließ auf Auslöschung der Fluoreszenz (engl.: *Quenching*) durch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen *m*-THPC-Molekülen schließen.^[225] Ein weiteres Indiz dafür, dass *m*-THPC nicht in einer monomolekularen Form solubilisiert wurde, ist die Tatsache, dass bei den Beladungsexperimenten keine 1:1-Stöchiometrie gefunden wurde. Möglicherweise liegen stattdessen Aggregate aus mehreren Konjugat- und Wirkstoffmolekülen vor. Bezogen auf die Struktur der Peptid-PEO-Konjugate scheint es durchaus möglich, dass sich durch deren amphiphile Natur, bestehend aus einem eher hydrophoben Peptid und einem gut wasserlöslichen PEO-Block als Kopfgruppe, Aggregate (z.B. Mizellen) bilden, in deren hydrophoben Peptid-Kern *m*-THPC eingelagert wird (**Abbildung 21**).

³ Die Untersuchungen mittels dynamischer Lichtstreuung von **PI-III** wurden in Kooperation mit Antje Voelkel und Prof. Dr. Helmut Schlaad vom Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Potsdam-Golm durchgeführt.

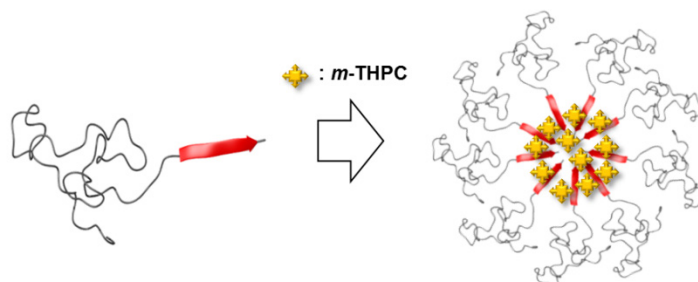


Abbildung 21. Schematische Darstellung der Aggregatbildung aus Peptid-PEO-Konjugatmolekülen und *m*-THPC.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden Lösungen der verschiedenen *m*-THPC/Konjugat-Komplexe mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht (vgl. Kapitel 6.12). Alle drei Systeme zeigten die Ausbildung von Aggregaten verschiedener Größe nach Beladung mit dem Gastmolekül (**Tabelle 2**). **PI** / *m*-THPC und **PIII** / *m*-THPC, welche einen eher geringen Beladungsgrad mit *m*-THPC aufwiesen, erreichten dabei hydrodynamische Radien von rund $R_h = 65$ nm bzw. $R_h = 75$ nm. Somit bewegen sich die Aggregate von **PI** und **PIII** in einer Größenordnung, welche sich ideal für die Ausnutzung des EPR-Effektes für passives *Targeting* erwiesen hat (10 nm bis 200 nm Durchmesser; vgl. Kapitel 2.2.4).^[87] **PII** / *m*-THPC auf der anderen Seite zeigte eine breite Verteilung mit einem hydrodynamischen Radius um $R_h = 165$ nm. Anders verhielt es sich bei Konjugat-Lösungen ohne *m*-THPC. Hier zeigten die beiden etwas hydrophileren Konjugate **PI** und **PIII** keine detektierbaren Aggregate, während **PII** mit seinem hydrophoben Leucin-Rest auch hier bereits vergleichbar kleine Aggregate von ca. $R_h = 40$ nm ausbildete. Somit trägt nur **PII** ein ausreichend hydrophobes Peptidsegment, um amphiphil genug zu sein, ohne die Anwesenheit von *m*-THPC Aggregate zu formen.

Tabelle 2. Hydrodynamische Radien der Konjugate **PI** – **PIII** in Wasser unbeladen und beladen mit *m*-THPC, gemessen mit dynamischer Lichtstreuung (n.d.: nicht detektierbar).

Konjugat	ohne <i>m</i> -THPC R_h in nm	mit <i>m</i> -THPC R_h in nm
PI	n.d.	64 ± 4 nm
PII	37 ± 7 nm	165 ± 22 nm
PIII	n.d.	75 ± 4 nm

3.3.4. Freisetzung von *m*-THPC

Die Solubilisierung in Aggregaten kann von Vorteil sein, besonders bezogen auf die Anwendung von Photosensibilisatoren (PS) wie *m*-THPC in der photodynamischen Therapie (PDT). Der Sensibilisator ist dabei durch die hohe lokale Konzentration im Kern und das daraus resultierende intermolekulare *Quenching* inaktiviert, da aggregiertes *m*-THPC kein $^1\text{O}_2$ produziert.^[229] Der Effekt des Fluoreszenz-*Quenchings* wurde auch für liposomale Formulierungen von *m*-THPC berichtet.^[230] Damit ist der PS auch gleichzeitig vor Photobleichung geschützt, welche direkt mit der $^1\text{O}_2$ -Konzentration in der Mikroumgebung von *m*-THPC zusammenhängt.^[231]

Die Inaktivierung des PS bis zur Freisetzung kann dazu führen, dass ungewünschte Nebenwirkungen, wie die Photosensibilisierung von gesundem Gewebe, reduziert werden und dass eine längere Zirkulation des Wirkstoffs in der Blutbahn durch Abschirmung und den Tarnkappen-Effekt der PEG-Aggregathülle erreicht wird. Die hier beschriebene inaktivierte Transportform wurde für alle der beschriebenen *m*-THPC / Konjugat-Komplexe ebenfalls durch die Abwesenheit von Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Wasser bestätigt (vgl. Kapitel 3.3.5).

Im Allgemeinen erfolgt bei intravenöser Injektion niedermolekularer Wirkstoffe die systemische Verteilung im Körper durch die Blutzirkulation, um in das entsprechende Ziel-Gewebe zu gelangen. Besonders bei hydrophoben Wirkstoffen wird das erreicht, indem diese in der Blutbahn schnell durch Serum Albumin oder andere Plasmaproteine aufgenommen werden. *m*-THPC bindet ebenfalls an Serum Albumin und Lipoproteine.^[211,232] Hydrophobe Wechselwirkungen scheinen dabei die Haupttriebkraft für die Bindung an Serum Albumin zu sein.^[233]

Die Aggregation von *m*-THPC mit den Konjugaten verlangte nun nach einer Untersuchung der Freisetzung des Wirkstoffs aus dem Kern der Aggregate. Durch die Bindungsaffinität von *m*-THPC zu Serum Albumin wurde Rinderalbumin (Bovines Serum Albumin, BSA) als Modellsystem und Zielmolekül für die Übertragung bzw. trans-Solubilisierung von *m*-THPC-Molekülen gewählt (**Abbildung 22**). Weiterhin sollte getestet werden, ob *m*-THPC dadurch effektiv aktiviert werden kann.

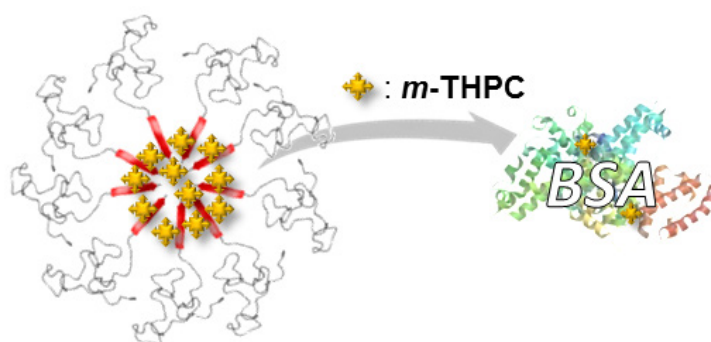


Abbildung 22. Schematische Darstellung der Übertragung (trans-Solubilisierung) von *m*-THPC-Molekülen aus Wirkstoff / Konjugat-Aggregaten zu BSA (BSA: PDB 3V03).

Dafür wurden zu verdünnten Lösungen der *m*-THPC / Konjugat-Komplexe mit Lösungen von BSA, welches häufig als Modell für das humane Serum Albumin dient, vermischt. Dabei war jeweils eine zunehmende, starke Fluoreszenzemission von *m*-THPC nach der Zugabe von BSA für die verschiedenen Systeme festzustellen (**Abbildung 23**). Dieser Anstieg der Fluoreszenz war ohne die Zugabe von BSA nicht zu beobachten (vgl. Kapitel 6.10, **Abbildung 55**). Vermutlich wurde durch ein Transfer von Wirkstoffmolekülen zu BSA das intermolekulare *Quenching* zwischen *m*-THPC Molekülen im Kern der Aggregate verringert, so dass mit zunehmender Übertragung und Monomerisierung der PS-Moleküle ein Anstieg der Fluoreszenzemission mit der Zeit ausgelöst wurde. Mechanistisch wäre der Transfer von Wirkstoffmolekülen über Stoßprozesse zwischen beiden Spezies, über Diffusion der niedermolekularen Gastmoleküle, oder auch über die Fusion der Proteine mit den *m*-THPC / Konjugat-Aggregaten denkbar. Die Kurven der Fluoreszenzentwicklung von **PI** und **PIII** zeigte dabei den Verlauf einer Reaktion erster Ordnung, während **PII** mit dessen starkem Anstieg zu Beginn der Messung eher den typischen Verlauf zweiter Ordnung aufwies. Da allerdings BSA im starken Überschuss eingesetzt wurde, könnte es sich bei **PI** und **PIII** auch um eine Reaktion pseudoerster Ordnung handeln. Wurde *m*-THPC / **PII** in deutlich geringerer Konzentration eingesetzt, glich der Kurvenverlauf dem von **PI** und **PIII** (vgl. **Abbildung 24**). Diese Konzentrationsabhängigkeit sprach für eine Reaktion pseudoerster Ordnung und einen Kollisionsprozess zwischen den Wirkstoff / Konjugat-Aggregaten und BSA, weniger für einen Diffusionsprozess von Wirkstoffmolekülen zwischen beiden Spezies.

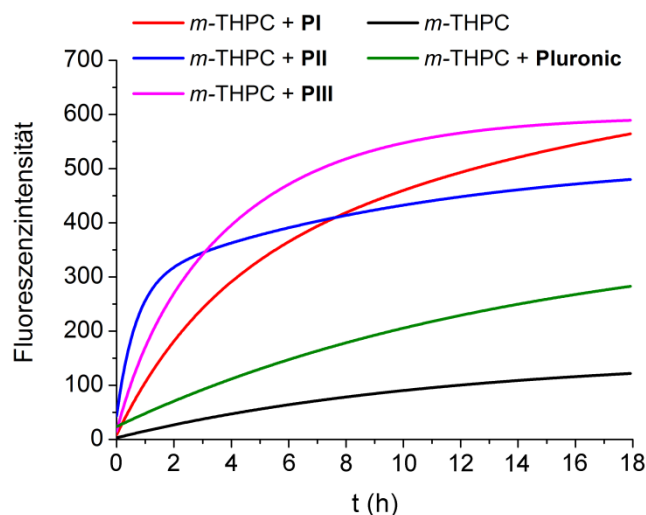


Abbildung 23. Zeitlicher Verlauf des Anstiegs der Fluoreszenzemission von *m*-THPC / Konjugat-Lösungen (**PI** – **PIII**) in Wasser nach Zugabe von BSA, sowie Kontrollexperimente mit freiem *m*-THPC und Pluronic® F68 beladen mit *m*-THPC ($t = 0$ min entspricht der Zugabe von BSA, Bedingungen: Anregung = 417 nm, Emission = 654 nm, $c[\text{BSA}] = 50 \mu\text{M}$; $c[m\text{-THPC}] = 1 \mu\text{M}$).

PI und **PIII** zeigten dabei einen effektiven Transfer von *m*-THPC zu BSA, bei der nach fünf bzw. drei Stunden die Fluoreszenz einen Wert von 50 % der Gesamtintensität erreichte. Bei **PII** verlief die Freisetzung noch einmal deutlich schneller und bereits nach ca. zwei Stunden waren 50 % der Fluoreszenzintensität messbar. Allerdings flachte der Anstieg daraufhin deutlich ab. Denkbar wäre zunächst eine erste, schubartige Freisetzung von weniger stark gebundenen *m*-THPC-Molekülen z.B. aus der PEO-Hülle der Aggregate. Die verbliebenen Gastmoleküle wiederum wären durch das veränderte *m*-THPC / PEO-Verhältnis stärker gegen das Protein abgeschirmt und sehr stark im Kern mit den hydrophoben Peptid-Segmenten von **PII** gebunden. Auch die größeren Aggregate, welche mittels DLS für **PII** im Vergleich zu **PI** und **PIII** gefunden wurden, könnten dazu beitragen. Somit würden die Wirkstoffmoleküle im Vergleich langsamer auf BSA übertragen werden. Für *m*-THPC, formuliert in PEGylierten Liposomen (Fospeg®), wurde bereits gezeigt, dass sich ein Wirkstoffdepot in der Lipid-Doppelschicht und eines in der PEO-Hülle befindet.^[230] Die Freisetzung in diesem System zeigte einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf mit einem initialen Schub und einem nachfolgenden starken Abflachen des Kurvenverlaufs. Im Vergleich der verschiedenen Konjugate miteinander zeigte sich, dass schon der Austausch einer einzigen Aminosäure wie im Fall von **PI** und **PII** (Glu₄ zu Leu₄) einen starken Einfluss auf das Freisetzungsprofil der einzelnen Transporter hatte. Die Freisetzungskinetiken waren somit stark von der jeweiligen

Aminosäuresequenz der Konjugate abhängig. Damit bietet sich die Möglichkeit, durch minimale Änderungen in der Sequenz das Profil der Freisetzung auf bestimmte Anforderungen einzustellen. Beachtlich ist auch, dass **PII** im späteren Verlauf der Messungen einen deutlich flacheren Kurvenverlauf zeigte als **PI** und **PIII**. **PII** wiederum war in der Lage, am meisten Wirkstoff zu solubilisieren und hatte somit die geringste Konjugatkonzentration bei den auf *m*-THPC normierten Proben. Damit könnte bei **PII** von einer deutlich schlechteren Abschirmung gegen die Übertragung auf das Zielprotein ausgegangen werden, was sich aber in den Messungen gegenteilig zeigte. Somit handelte es sich bei der unterschiedlich schnellen Entwicklung der Fluoreszenz nicht um einen Effekt, welcher durch die verschiedenen Konzentrationen an Konjugat in den Lösungen ausgelöst wurde. Die Beobachtungen werden somit wahrscheinlich auf die Stärke der nichtkovalenten Bindung des Wirkstoffs zurückführen sein.

Zusätzlich wurden die maßgeschneiderten Peptid-Polymer-Konjugate mit einem Löslichkeitsvermittler und Tensid in Form eines PEO-PPO-PEO-Triblock-Copolymers, Pluronic® (F68), verglichen. Pluronic® erreichte dabei einen fünffach höheren Beladungsgrad (1.46 mmol *m*-THPC pro mmol Polymer), als **PII**. Dieses Ergebnis war allerdings nicht weiter überraschend, da Pluronic® ein höheres Molekulargewicht von $M_n = 8350$ g/mol und zusätzlich einen deutlich größeren hydrophoben Block im Vergleich zu den Peptidsegmenten der Konjugate aufweist. Allerdings zeigte die trans-Solubilisierung zu BSA eine nur sehr langsame Freisetzung. Nach 18 h Messzeit wurden nur rund 47 % der Fluoreszenzintensität erreicht, welche **PIII** gezeigt hatte. Somit wird *m*-THPC solubilisiert mit Pluronic® F68 deutlich langsamer aktiviert. Darin zeigt sich der übliche Nachteil von Block-Copolymer Transporter-Systemen, welche das Gastmolekül über unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen bindet, wobei die Freisetzungskinetik nicht ohne weiteres feinjustiert werden kann.

Ob das mit Hilfe der Konjugate solubilisierte *m*-THPC tatsächlich Vorteile gegenüber dem freien Wirkstoff bietet, galt es ebenfalls zu überprüfen. Daher wurde des Weiteren die Aufnahme von freiem *m*-THPC ohne Löslichkeitsvermittler durch BSA getestet. Um eine fein verteilte, kolloidale Form von *m*-THPC zu erreichen, wurde zunächst eine ethanolische Lösung von *m*-THPC in einer Küvette verdampft und anschließend die wässrige Lösung von

BSA hinzugegeben. Wie in **Abbildung 23** zu sehen, wurde *m*-THPC trotz Bemühungen, eine vergleichsweise große Oberfläche zu erzeugen, ohne Transporter nur sehr langsam von BSA aufgenommen und erreichte nach 18 h eine Fluoreszenzintensität von rund 17 % verglichen mit den Peptid-PEO-Konjugaten. Die verzögerte Aufnahme durch Serum Albumin, wie im Falle von *m*-THPC solubilisiert mit Pluronic[®] bzw. des freien Wirkstoffs ohne Transporter, birgt das Risiko beträchtlicher Nebenwirkungen während der photodynamischen Therapie. Lange Zirkulation in der Blutbahn und retardierte Aktivierung des Wirkstoffs über eine lange Zeit kann zu einer Sensibilisierung gegenüber Licht für Tage bis Wochen führen, welche auch zu Verbrennungen der Haut und Netzhautschäden bei Sonneneinstrahlung führen kann.^[1,234]

Die Bedingungen, unter denen die Fluoreszenzkinetiken gemessen wurden, haben möglicherweise Auswirkungen auf die Stabilität der Aggregate, die Struktur des Zielproteins und die Löslichkeit von *m*-THPC, ebenso wie die Anregung des PS und damit verbundene Erzeugung von ¹O₂. Daher sollte der Einfluss verschiedener Parameter wie Temperatur, pH-Wert und die Häufigkeit der Anregung des Photosensibilisators auf den Verlauf der Fluoreszenzkinetiken aufgeklärt werden. Zunächst galt es zu überprüfen, ob sich eine häufige Anregung des Wirkstoffs in der Fluoreszenzkinetik auf die Messergebnisse auswirkt. Denkbar wäre z.B. Photobleichung, also die photochemische Zerstörung des Fluorophors durch dessen Anregung, sowie die Beschädigung des Serum Albumins oder der Biokonjugat-Transporter durch den bei der Anregung erzeugten ¹O₂. Daher wurden Vergleichsmessungen gegenübergestellt, bei denen eine Probe alle 2 Minuten und eine identische Probe alle 20 Minuten angeregt wurde (vgl. Kapitel 6.10, **Abbildung 53**). Dabei konnte keine Veränderung des Kurvenverlaufs festgestellt werden. Die Energie der Anregung des Fluoreszenzspektrometers scheint also nicht auszureichen, um *m*-THPC nennenswert zu bleichen oder Moleküle in der Umgebung durch ¹O₂ zu zerstören, selbst bei häufiger Anregung (540-mal) über einen Zeitraum von 18 h. Anschließend wurden Messungen bei verschiedenen pH-Werten der gepufferten Lösungen durchgeführt. Auch hier konnte durch die Veränderung des pH-Wertes der Lösungen der *m*-THPC / **PII**-Komplexe kein nennenswerter Einfluss auf die Freigabekinetiken beobachtet werden (vgl. Kapitel 6.10, **Abbildung 54**). Eine veränderte Temperatur wiederum kann diverse Effekte auf die Geschwindigkeit der Freisetzung des Gastmoleküls aus den Transporter-Aggregaten haben. Zum einen ist durch die höhere Braunsche Molekularbewegung die Stoßrate zwischen den Molekülen höher, so dass die Übertragung von Molekülen durch Stoßprozesse beschleunigt

wird.^[235] Aber auch Diffusionsprozesse finden bei höheren Temperaturen schneller statt. Außerdem kann die Erhöhung der Temperatur zu einer verringerten Hydrathülle der PEO-Ketten führen, wodurch die Abstoßung zwischen den Ketten und der hydrodynamische Radius der Aggregate abnehmen könnten. Des Weiteren existieren Methoden wie die lokale, therapeutische Hyperthermie, bei welcher der Tumor zunächst fixiert und anschließend mittels gebündelter Radiowellen auf 42 – 44 °C erwärmt wird. Diese Methode wird eingesetzt, um in Kombination mit Chemo- oder Strahlentherapie die Effektivität der Therapie zu erhöhen. Somit wäre es interessant, ob durch Effekte wie Hyperthermie eine beschleunigte Abgabe aus den Aggregaten erreicht werden kann, um potentiell die Effektivität der PDT zu verbessern. Daher wurden identische Proben von *m*-THPC solubilisiert mit **PII** bei verschiedenen Temperaturen gemessen, wobei Messungen bei Raum- (25 °C) und Körper-temperatur (37 °C), sowie bei Temperaturen, welche bei moderater und starker Hyperthermie eingesetzt werden (42 und 45 °C), gegenübergestellt wurden (**Abbildung 24**). Dafür wurden die Messungen an einem temperierbaren Mikropplatten-Spektralphotometer (vgl. Kapitel 6.10) durchgeführt. Hierfür musste im Vergleich zu bisher durchgeführten Messungen eine 10-fach geringere Konzentration an *m*-THPC genutzt werden, was zu einem leicht veränderten Kurvenverlauf führte. Der initiale Schub, welcher vorher bei **PII** beobachtet wurde, war hier nicht zu erkennen. Die Fluoreszenzemission von *m*-THPC stieg nach der Zugaben der BSA-Lösung gleichmäßig über die Messzeit an. Die daraus zu erkennende Konzentrationsabhängigkeit der Entwicklung der Fluoreszenz von *m*-THPC lässt einen Stoßprozess für die trans-Solubilisierung des Wirkstoffs auf das Zielprotein schließen.^[236] Somit wurde in nachfolgenden Experimenten *m*-THPC solubilisiert mit **PII** als Referenz ebenfalls neu gemessen, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Wie zu erwarten, war eine deutliche Beschleunigung der Freisetzung mit steigenden Temperaturen zu beobachten. Bei 42 und 45 °C wurde nach 12 h Messzeit ein Plateau erreicht, während die Fluoreszenzintensität der Proben bei 25 und 37 °C weiter anstieg. Nach 2 h wird für die Probe bei 45 °C eine Intensität von rund 62 % des Endwertes erreicht, während die Proben bei Raum- und Körpertemperatur zu diesem Zeitpunkt erst ca. 27 % bzw. 41 % der Intensität aufweisen. Somit könnte durch lokal angewendete Hyperthermie die Freisetzung von mit **PII** solubilisiertem *m*-THPC gezielt in Tumorgewebe stark erhöht werden, um einen therapeutischen Vorteil zu erlangen.

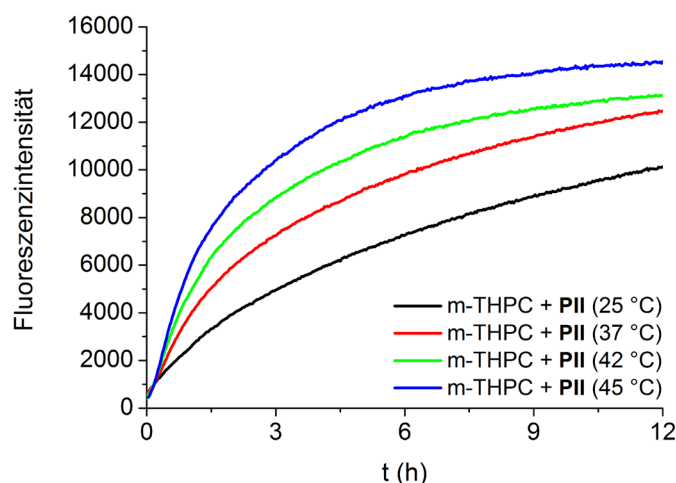


Abbildung 24. Entwicklung der Fluoreszenz-Emission bei unterschiedlichen Temperaturen von *m*-THPC / **PII** über die Zeit gemessen nach Zugabe von BSA ($t = 0$ min entspricht der Zugabe von BSA, Bedingungen: Anregung = 417 nm, Emission = 654 nm, $c[\text{BSA}] = 100 \mu\text{M}$; $c[m\text{-THPC}] = 0.1 \mu\text{M}$).

3.3.5. Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch *m*-THPC

Die Fluoreszenzemission ist ein guter Indikator für die Fähigkeit von *m*-THPC effektiv Singulett-Sauerstoff generieren zu können. Eine direkte Aussage über die Aktivität kann allerdings über die Messung der Lumineszenz des durch den Photosensibilisator erzeugten Singulett-Sauerstoffs bei 1270 nm getroffen werden.⁴ Daher wurden zeitaufgelöste Messungen der $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz nach Zugabe von BSA zu den *m*-THPC / Konjugat-Komplexen von **PII** und **PIII** gemessen (**Abbildung 25**), da diese in der Fluoreszenzkinetik besonders vielversprechende Ergebnisse lieferten. **PII** und **PIII** zeigten bisher starke Unterschiede im Verhalten, während sich **PI** von der Geschwindigkeit der Entwicklung der Fluoreszenz zwischen diesen einordnete. Die quantitative Messung der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff wurde dabei durch die Anregung des Wirkstoffs mit Licht-emittierenden Dioden (LED) bei 425 nm und der Messung dessen Emission von Lumineszenz bei 1270 nm erreicht.^[237] Somit konnte der Übergang von der inaktivierten, solubilisierten Form des *m*-THCPs in die pharmazeutisch aktive, $^1\text{O}_2$ -produzierende Form durch trans-Solubilisierung zu Serum Albumin direkt verfolgt werden.

⁴ Die Untersuchungen zur Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz wurden in Kooperation mit Dr. Steffen Hackbarth und Prof. Dr. Beate Röder vom Institut für Physik der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt.

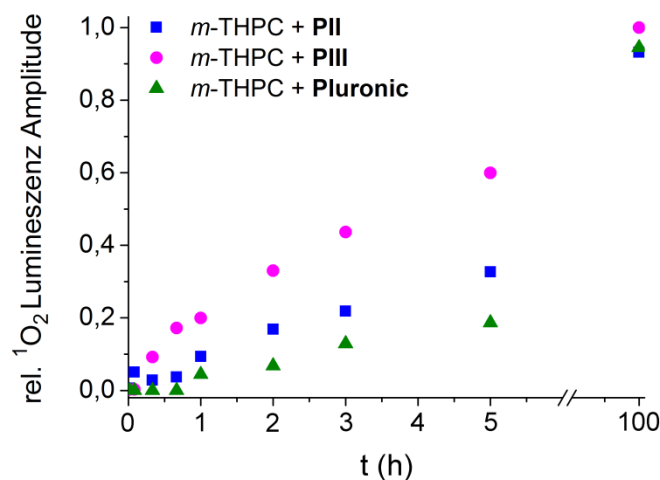


Abbildung 25. Entwicklung der $^1\text{O}_2$ -Produktion mit der Zeit nach Zugabe von BSA zu Lösungen von **PII**, **PIII** und Pluronic® F68 beladen mit *m*-THPC ($t = 0$ min entspricht der Zugabe von BSA, Bedingungen: Anregung = 425 nm, Emission = 1270 nm, BSA = 100 μM ; *m*-THPC = 2 μM ; die Signale der Amplitude sind gegeben als normierte Werte bezogen auf den Wert gegeben nach 100 h Messzeit).

Auch hier zeigte sich wieder die starke Abhängigkeit der Aktivierungskinetiken von den Sequenzen der Biokonjugate. Die Entwicklung der $^1\text{O}_2$ -Produktion korrelierte mit den gemessenen Kurven der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie (vgl. Kapitel 3.3.4). Des Weiteren erreichten alle Systeme nach 100 h Inkubation nahezu dieselbe $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeute. Dessen Entwicklung hing dabei allerdings stark vom entsprechenden Transporter ab. Das System *m*-THPC / Pluronic® F68 erreichte eine Aktivität von rund 20 % nach fünf Stunden. Zu diesem Zeitpunkt war *m*-THPC solubilisiert mit **PIII** bereits zu 60 % aktiviert, was sich gut mit den fluoreszenzspektroskopischen Daten deckt. Dass sich bei **PII** ein langsamerer Anstieg und kein initialer Schub erkennen lässt, wie es bei der Fluoreszenzkinetik (vgl. **Abbildung 23**) der Fall war, lässt sich möglicherweise mit der Tatsache erklären, dass im Vergleich zur Fluoreszenz die Verfügbarkeit von Sauerstoff in der direkten Umgebung des Photosensibilisators für die Erzeugung von $^1\text{O}_2$ eine große Rolle spielt. **PII** bildete die deutlich größeren Aggregate als **PIII**, welche mit fortschreitender trans-Solubilisierung zu BSA wohlmöglich ebenfalls eine fluoreszierende Spezies darstellen. Dennoch war durch den höheren hydrodynamischen Radius der Aggregate von **PII** mit *m*-THPC die Zugänglichkeit der PS-Moleküle zu molekularem Sauerstoff im Vergleich zu

PIII wohlmöglich geringer, was den langsameren Anstieg der $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz erklären könnte.

Somit konnte über die Entwicklung der $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz der Übergang des Wirkstoffs vom inaktivierten, aggregierten Zustand in seine aktive, monomerisierte Form direkt nachverfolgt werden. Wie bereits bei den Fluoreszenzkinetiken war auch die Erzeugung von $^1\text{O}_2$ direkt von der Aminosäuresequenz der Konjugate abhängig. Damit lässt sich die Geschwindigkeit der Aktivierung der PS über Veränderungen der Peptidsequenz fein justieren. Im Vergleich zu dem Triblock-Copolymer Pluronic[®] F68 war wieder eine deutlich schnellere Übertragung auf BSA zu beobachten. Auch wenn bezogen auf die beiden Konjugate **PII** und **PIII** das zweite einen steileren Anstieg der $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz erreichte, so wurde in Anbetracht des sehr hohen Beladungsgrades dennoch **PII** als ein guter Ausgangspunkt für die Entwicklung von Wirkstofftransportern für *m*-THPC auf Basis von Peptid-PEO-Konjugaten ausgewählt.

3.3.6. *Screening* für geeignete Bindungspartner in organischen Lösemitteln

Die bisher untersuchten Systeme, welche auf Basis des *Screenings* gegen *m*-THPC entwickelt wurden, wiesen eine sehr schnelle und effektive trans-Solubilisierung des Wirkstoffs zu Transportproteinen der Blutbahn wie Serum Albumin auf. Damit können sie primär als Solubilisatoren eingestuft werden, die den Wirkstoff einem biologischen System schnell zur Verfügung stellen und somit die Biodistribution deutlich verbessern können. Transportersysteme für Wirkstoffverabreichung (engl. *Drug Delivery*) hingegen sollten den Wirkstoff so lange binden, bis er an seinem Zielort angekommen ist. Daher war es ebenfalls von Interesse, das *Screening*-Verfahren zum Identifizieren geeigneter Peptidsequenzen für die nichtkovalente Bindung der Wirkstoffe dahingehend weiterzuentwickeln, dass eine sehr starke Bindung zum Wirkstoff herrscht und eine Verlangsamung der Gastmolekül-Freisetzung erreicht wird. Ziel war es, damit einem möglichst breiten Spektrum an verschiedenen pharmakokinetischen Anforderungen gerecht werden zu können.

Die Bedingungen des *Screenings* der Peptidbibliothek **Bib1** gegen *m*-THPC wurden bisher so gewählt, dass der Wirkstoff im Lösemittelgemisch (1 : 9 Ethanol / Wasser) schlecht löslich und somit bestrebt war, möglichst schnell die wässrige Umgebung zu verlassen und z.B. an eine hydrophobe Peptidsequenz der Bibliothek zu binden. Wird allerdings für das *Screening* ein Lösemittel gewählt, in welchem der Wirkstoff gut löslich ist, so könnte möglicherweise

die Bindung an Peptidsequenzen mit eher geringer Affinität unterdrückt und tendenziell stärkere Binder selektiert werden. Dimethylsulfoxid (DMSO) ist zum Beispiel dafür bekannt, die Bindung zwischen niedermolekularen Liganden und Biomolekülen wie Peptiden und Proteinen zu schwächen.^[238] DMSO wird aufgrund seiner guten Löslichkeitseigenschaften, niedrige chemische Reaktivität und geringem Dampfdruck standardmäßig in Hochdurchsatz-*Screenings* als Co-Solvent eingesetzt. *m*-THPC ist ebenfalls gut in DMSO löslich. Daher sollten weiterführend über ein *Screening* von *m*-THPC gegen die **Bib1** in reinem DMSO Peptide identifiziert werden, die eine höhere Affinität gegenüber dem Photosensibilisator besitzen, als es bei den bisherigen Systemen (**PI** – **PIII**) der Fall war.

Wie bereits beim *Screening* in Wasser / Ethanol wurden fluoreszierende Harzpartikel manuell isoliert und dessen Aminosäuresequenzen nach Abspaltung von der festen Phase mit Cyanbromid mittels MALDI-ToF-MS/MS sequenziert (vgl. Kapitel 3.2.2). Es wurden insgesamt 40 Partikel isoliert und analysiert (**Abbildung 26A** und Kapitel 7.2, **Tabelle 19**). Dabei war zu beobachten, dass im Vergleich zum *Screening* im Wasser-Ethanol-Gemisch hydrophobe Aminosäuren wie Leucin und Phenylalanin weniger häufig in den Sequenzen zu finden waren, während polar-neutrale Aminosäuren wie Glutamin und Serin und anionische Glutaminsäure häufiger selektiert wurden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Stärke unpolarer Bindungen wie π - π -Wechselwirkungen beim Wechsel von einem stark polaren protischen Lösemittel wie Wasser zu einem polar aprotischen Lösemittel wie DMSO abnimmt.^[239] Ebenso verringert sich die enthalpische Triebkraft, welche bei der Verdrängung von Wassermolekülen durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Peptid entsteht. Somit verlieren wahrscheinlich Wechselwirkungen mit Leucin und Phenylalanin an Bedeutung für die nichtkovalente Bindung des Wirkstoffs, während Wasserstoffbrückenbindungen zu polaren (Gln und Ser) und geladenen (Glu) Aminosäuren in der Vordergrund rücken.

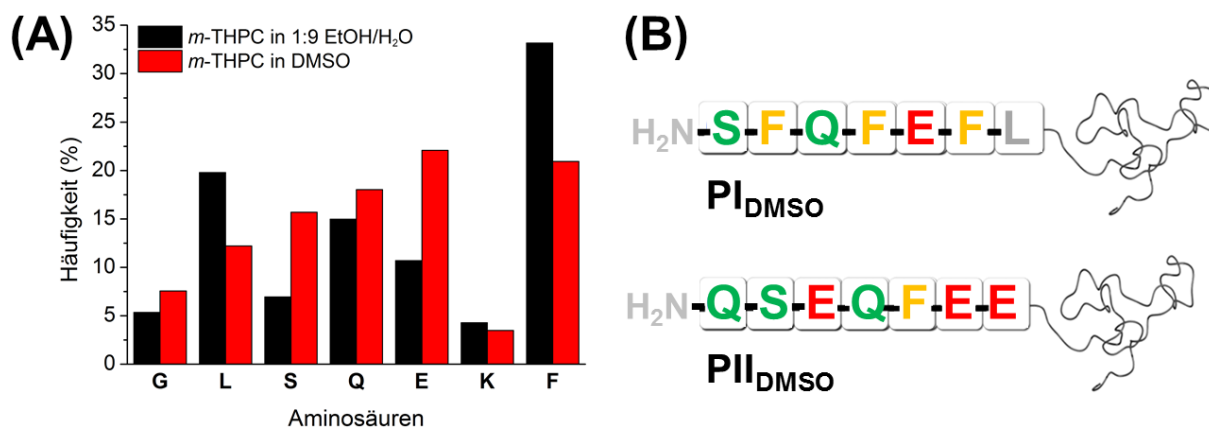


Abbildung 26. (A) Vergleich der prozentualen Zusammensetzung der gefunden Aminosäuren des Screenings der **Bib1** gegen *m*-THPC in Ethanol / Wasser (1:9) und in DMSO als Lösungsmittel. (B) Aminosäuresequenzen der Peptid-PEO-Konjugate **PI_{DMSO}** und **PII_{DMSO}**.

Aus den identifizierten Aminosäuresequenzen wurden zwei ausgewählt und als Peptid-PEO-Konjugate mit einem PEO-Block von $M_n = 3.2 \times 10^3$ g/mol synthetisiert (**PI_{DMSO}** und **PII_{DMSO}**, **Abbildung 26B**). **PI_{DMSO}** setzte sich dabei aus drei Phenylalanin-Resten zusammen, welche jeweils von einem Glutamin- oder Glutaminsäure-Rest voneinander getrennt waren, flankiert von einem *N*-terminalen Glutamin und *C*-terminalen Leucin. **PII_{DMSO}** hingegen verfügte nur über ein Phenylalanin, dafür aber über drei polare (Ser und Gln) und drei anionische Reste (Glu). Bei der Beladung der Konjugate mit *m*-THPC zeigte sich allerdings, dass nur **PI_{DMSO}** in der Lage war, nennenswerte Konzentrationen des Wirkstoffs in wässrige Lösung zu bringen (**Tabelle 3**). **PI_{DMSO}** erreichte einen Beladungsgrad von 0.18 mmol pro mmol Konjugat (Verhältnis 1 : 5.6 von *m*-THPC zu **PI_{DMSO}**). Damit erwies sich **PII_{DMSO}** für die nachfolgenden Untersuchungen als ungeeignet. In Anbetracht der Aminosäuresequenzen der beiden Konjugate kann davon ausgegangen werden, dass ein sehr polares und negativ geladenes Peptidsegment wie im Fall von **PII_{DMSO}** nicht geeignet ist, um *m*-THPC effektiv zu binden. **PI_{DMSO}** hingegen besitzt drei aromatische (Phe) und einen hydrophoben (Leu) Rest über seine Sequenz verteilt und ist somit von der Zusammensetzung der Aminosäuren nahe an den ursprünglichen Systemen **PI – PIII**. Der Beladungsgrad von **PI_{DMSO}** fiel dennoch geringer aus als im Fall von **PII** (H₂N-QFFLFFQ-PEO, 0.31 mmol *m*-THPC pro mmol **PII**), was wahrscheinlich an der geringeren Anzahl und weniger Block-artigen Zusammensetzung der aromatischen Aminosäuren lag. Auch bezüglich der Aggregation von **PI_{DMSO}** mit *m*-THPC ließen sich im Verhältnis zu **PII** nur relativ kleine Aggregate mit einem hydrodynamischen Radius von 51 ± 1 nm mittels DLS bestimmen. Damit verhält sich **PI_{DMSO}**

ähnlich wie **PI** und **PIII**, welche auch eine etwas weniger hydrophobe Sequenz verglichen mit **PII** besitzen. Ebenso konnte für **PI_{DMSO}** ohne Beladung mit *m*-THPC keine Ausbildung von Aggregaten im messbaren Bereich festgestellt werden.

Tabelle 3: Beladungsgrad der Konjugate (**PI_{DMSO}** und **PII_{DMSO}**) hervorgegangen aus dem *Screening* in DMSO mit *m*-THPC (n.d. = nicht detektierbar).

Peptid-Polymer-Konjugat	Konzentration <i>m</i> -THPC [mmol/mmol Konjugat]	Verhältnis <i>m</i> -THPC / Konjugat
PI_{DMSO}	0.18	1 : 5.6
PII_{DMSO}	n.d.	-

Die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenzemission von *m*-THPC solubilisiert mit **PI_{DMSO}** nach der Zugabe von BSA zeigt einen dramatischen Unterschied des Anstiegs im Vergleich zu **PII** (**Abbildung 27**). Bei **PI_{DMSO}** wurde der Wirkstoff nach Zugabe von BSA deutlich langsamer aktiviert und wies nach einer Messzeit von 18 h lediglich eine Fluoreszenzintensität auf, welche 42 % der Intensität von *m*-THPC / **PII** entsprach. Der Effekt fiel so stark aus, dass er nicht ausschließlich auf dem geringeren Beladungsgrad von **PI_{DMSO}** und daraus resultierender stärkerer Abschirmung durch den höheren PEO-Anteil im Verhältnis zum Wirkstoff beruhen konnte. Somit ist die deutlich langsamere Freisetzung wahrscheinlich auf eine höhere Bindungsaffinität der Sequenz von **PI_{DMSO}** zu *m*-THPC im Vergleich zu **PII** zurückzuführen. Somit könnte das Ziel erreicht werden, durch die Verwendung eines organischen Lösemittels beim Screening, welches unpolare Bindungen unterdrückt und die enthalpische Triebkraft bei der Verdrängung von Wassermolekülen durch hydrophobe Wechselwirkungen verringert, besonders starke Binder für *m*-THPC zu selektieren.

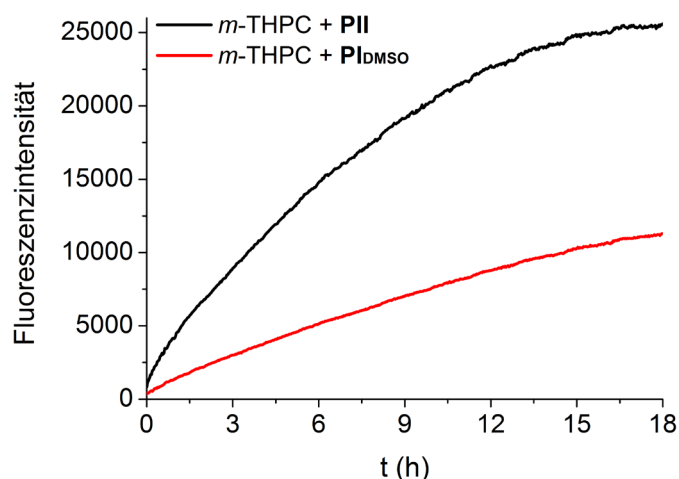


Abbildung 27. Entwicklung der Fluoreszenzemission von *m*-THPC solubilisiert mit **PI_{DMSO}** im Vergleich zu **PII** über die Zeit ($t = 0$ min entspricht der Zugabe von BSA, Bedingungen: Anregung = 417 nm, Emission = 654 nm, $c[\text{BSA}] = 100 \mu\text{M}$; $c[m\text{-THPC}] = 0.1 \mu\text{M}$).

3.4. Konjugat-Architekturen⁵

Durch das *Screening* der Peptidbibliothek gegen *m*-THPC und den dabei gefundenen Aminosäuresequenzen wurde erfolgreich eine Basis geschaffen, um den Photosensibilisator mit Hilfe von Peptid-PEO-Konjugaten zu solubilisieren. Inwiefern es allerdings möglich ist, durch anderweitige Modifikationen der Konjugat-Struktur Einfluss auf deren Eigenschaften als Löslichkeitsvermittler für *m*-THPC zu nehmen, sollte weiterführend untersucht werden.^[240,241] Ziele waren unter anderem die Erhöhung der Beladungskapazität sowie das Steuern der Freisetzungskinetik über andere Modifikationen als den Austausch von Aminosäuren.

3.4.1. Einfluss einer veränderten PEO-Block-Länge auf die Solubilisatoren

Da die bisher verwendeten Konjugate aus einem Peptid- und einem PEO-Block bestehen, bieten sich entsprechend zwei grundsätzliche Herangehensweisen für die Modifikation der Konjugate. Erster Bestandteil der Untersuchung waren die Auswirkungen einer Veränderung des Molekulargewichtes des Polymer-Blocks auf das Verhalten der Solubilisatoren. Bisher

⁵ Die Synthese der Konjugate, sowie Messungen zum Beladungsgrad und hydrodynamischen Radius in diesem Abschnitt wurden von Timm Schwaar im Rahmen seiner Bachelor-Arbeit (2012) durchgeführt.^[252]

wurde für alle untersuchten Konjugate ein PEO-Block mit einem mittleren Molekulargewicht von 3.2×10^3 g/mol verwendet. Daher wurde nun die Aminosäuresequenz von **PII** an zwei weitere PEO-Blöcke mit unterschiedlichem mittleren Molekulargewicht konjugiert (8.5×10^2 g/mol und 5.2×10^3 g/mol). Daraus ergibt sich eine theoretische Länge der Konjugate bei vollständig ausgestreckter PEO-Kette von 9.1 nm (8.5×10^2 g/mol PEO), 25.6 nm (3.2×10^3 g/mol PEO) und 43.8 nm (5.2×10^3 g/mol PEO) für die Variationen von **PII**. Die somit erhaltenen Konjugate **PII**₈₅₀ und **PII**₅₂₀₀ wurden, ebenso wie **PII** als Vergleichsexperiment, nach bereits beschriebenem Protokoll (vgl. Kapitel 3.3.1) mit *m*-THPC beladen und die Konzentration an solubilisiertem PS absorptionsspektroskopisch bestimmt (**Tabelle 4**). Dabei zeigte sich, dass die maximale Beladungskapazität der Konjugate mit höherem Molekulargewicht (**PII** und **PII**₅₂₀₀) sich nur marginal unterscheidet. Das war ein weiterer Beweis dafür, dass primär das Peptidsegment die Bindung zu *m*-THPC vermittelt. Der PEO-Block hatte keinen Einfluss auf die Menge an solubilisiertem PS. **PII**₈₅₀ hingegen war nicht in der Lage, nennenswerte Mengen an *m*-THPC in wässriger Lösung zu halten. Das Molekulargewicht der beiden Blöcke des Konjugats **PII**₈₅₀ war mit 8.5×10^2 g/mol im Fall des PEO-Blocks und 976 g/mol für das Peptidsegment in einer vergleichbaren Größenordnung. Anscheinend war der PEO-Block in diesem Fall bereits zu klein, um eine ausreichende Wasserlöslichkeit des Komplexes mit dem hydrophoben Wirkstoff gewährleisten zu können.

Tabelle 4. Beladungsgrade der Konjugate mit verschiedenen PEO-Block-Molekulargewichten bezüglich *m*-THPC (n.d. = nicht detektierbar).

Peptid-Polymer-Konjugat	Konzentration <i>m</i> -THPC [mmol/mmol Konjugat]	Verhältnis <i>m</i> -THPC / Konjugat
PII ₈₅₀	n.d.	-
PII	0.31	1 : 3.2
PII ₅₂₀₀	0.27	1 : 3.7

Um den Einfluss der veränderten PEO-Block-Länge auf die Bildung und Größe von Aggregaten aufzuklären, wurden die Varianten von **PII** mittels Dynamischer Lichtstreuung untersucht (**Tabelle 6**). **PII**₈₅₀ wurde allerdings dabei vernachlässigt, da es nicht in der Lage

war, nennenswerte Mengen an *m*-THPC zu solubilisieren. Zunächst wurde eine Lösung des Konjugats **PII**₅₂₀₀ ohne *m*-THPC untersucht und mit **PII** verglichen. Es zeigte mit 13 ± 5 nm einen geringeren hydrodynamischen Radius, als **PII** ($R_h = 37 \pm 5$ nm). Diese Beobachtung bestätigte sich auch nach der Beladung des Konjugats mit *m*-THPC. Hier war der Radius der Aggregate von **PII**₅₂₀₀ mit *m*-THPC ($R_h = 120 \pm 4$ nm) deutlich kleiner als bei **PII** ($R_h = 165 \pm 22$ nm). Die größeren Aggregate von **PII** lassen sich möglicherweise mit dem im Verhältnis größeren hydrophoben Anteil aufgrund des kleineren PEO-Blocks verglichen mit **PII**₅₂₀₀ erklären.^[242] Außerdem wäre im Falle einer idealen Mizelle bedingt durch den höheren sterischen Anspruch des PEO-Blocks bei **PII**₅₂₀₀ ein größerer Winkel zwischen den Konjugatmolekülen nötig, was möglicherweise nur kleinere Aggregationszahlen erlaubt. Des Weiteren ist die kritische Kettenlänge für ein Verknäulen der PEO-Blöcke im Fall von **PII**₅₂₀₀ überschritten, was die Größe der Aggregate weiter herabsetzen würde.^[243] In Gegensatz dazu muss sich **PII**, welches einen kleinen hydrophoben PEO-Block trägt, zu einem höheren Maße reorganisieren, um die Oberfläche der hydrophoben *m*-THPC-Moleküle mit ausreichend PEG für kolloidale Stabilität zu sättigen.

Nach der Evaluation der Beladungsgrade, sowie der hydrodynamischen Radien sollte nun die Auswirkung eine Variation des Molekulargewichtes des PEO-Blocks auf die Freisetzungs- und Aktivierungskinetik von *m*-THPC aus Aggregaten mit den Transportern überprüft werden. **PII**₈₅₀ wurde nicht untersucht, da es keine nennenswerte Konzentration an *m*-THPC solubilisiert hatte und somit keine verlässliche Messung durchführbar war. Somit konnten nur **PII** und **PII**₅₂₀₀ miteinander verglichen werden (**Abbildung 28**). Der größere PEO-Block von **PII**₅₂₀₀ ließ erwarten, dass eine stärkere Abschirmung gegen das Protein und damit eine retardierte trans-Solubilisierung zu BSA stattfinden würde. Allerdings zeigte sich ein gegenteiliger Effekt. Die Fluoreszenzemission von *m*-THPC solubilisiert mit **PII** erreichte nach einer Messzeit von 18 h im Vergleich zu **PII**₅₂₀₀ lediglich ca. 52 % der Intensität. In Anbetracht der geringeren Aggregatgröße, welche für **PII**₅₂₀₀ im Vergleich zu **PII** beobachtet wurde, wird allerdings auch eine größere Grenzfläche von den *m*-THPC / **PII**₅₂₀₀-Komplexen bereitgestellt. Bei Übertragung des Wirkstoffs über Kollisionsprozesse könnte die Effektivität der Übertragung von *m*-THPC auf das Zielprotein durch die größere Grenzfläche zwischen Wirkstoff / Konjugat-Aggregaten und dem Protein gesteigert werden.

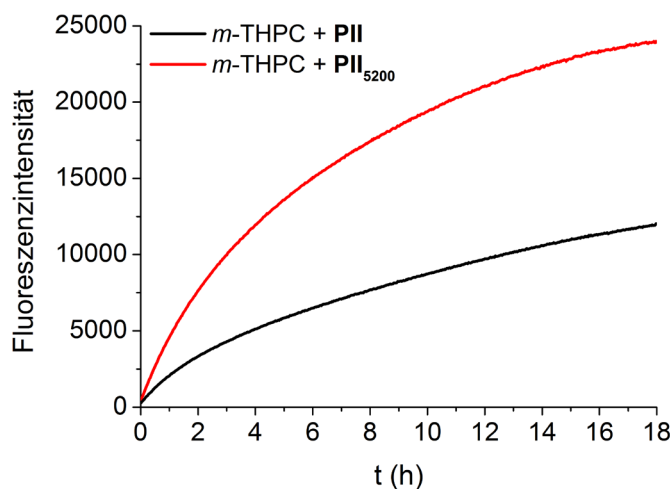


Abbildung 28. Fluoreszenzkinetiken von *m*-THPC solubilisiert mit **PII** und **PII₅₂₀₀** ($t = 0$ min entspricht der Zugabe von BSA, Bedingungen: Anregung = 417 nm, Emission = 653 nm, $c[\text{BSA}] = 100 \mu\text{M}$; $c[m\text{-THPC}] = 0,1 \mu\text{M}$).

Somit konnte bezüglich der Veränderung des PEO-Blocks der Biokonjugate gezeigt werden, dass das Molekulargewicht einen kritischen Wert nicht unterschreiten darf. Während **PII** mit einem PEO-Block von $3,2 \times 10^3 \text{ g/mol}$ sich als guter Löslichkeitsvermittler für *m*-THPC erwies, konnte **PII₈₅₀** mit einem PEO-Block von $8,5 \times 10^2 \text{ g/mol}$ *m*-THPC nicht solubilisieren. Wiederum hatte die Erhöhung des PEO-Molekulargewichts auf $5,2 \times 10^3 \text{ g/mol}$ keinen Einfluss auf die Beladungskapazität, was bestätigt, dass nur das Peptidsegment die nichtkovalente Bindung des Wirkstoffs vermittelt. Des Weiteren sorgte ein größerer PEO-Block nicht für größere Aggregate und eine stärkere Abschirmung des Wirkstoffs, was sich in einer schnelleren Freisetzung widerspiegelt.

3.4.2. Einfluss einer veränderten Architektur des Peptidsegments

Nachdem zunächst der Einfluss des PEO-Blocks auf die Eigenschaften der Konjugate als Solubilisatoren für *m*-THPC untersucht wurde, lag als zweites das Peptid-Segment im Fokus. Dafür wurden zwei weitere Konjugate synthetisiert, bei denen ausgehend von **PII₅₂₀₀** der Peptid-Block jeweils verdoppelt bzw. verdreifacht wurde. Ein PEO-Block von $5,2 \times 10^3 \text{ g/mol}$ wurde gewählt, um auch bei größeren Peptidsegmenten ausreichende Wasserlöslichkeit der Konjugate zu gewährleisten. Das Peptidsegment wurde in einem Fall *N*-terminal mit einer flexiblen Alkylkette (6-Aminohexylsäure) verlängert und eine zweite Kopie des Peptid-

Blocks von **PII** / **PII₅₂₀₀** gekuppelt (**PII-ahx-PII**, **Abbildung 29**). Die Alkylkette wurde zwischen die Peptidsequenzen eingebracht, um eine möglichst effektive Organisation der Bindungssegmente um den Wirkstoff zu ermöglichen. In den Bindungsstudien zu **PII** zeigte sich eine eher lineare Struktur des Peptids, welche von einer Seite an den planaren Wirkstoff bindet. Durch den flexiblen Abstandhalter wird gegebenenfalls auch eine zangenartige Bindung von beiden Seiten des Wirkstoffs möglich. Im zweiten Fall wurde die Grundstruktur von **PII₅₂₀₀** mit einem Lysin-Rest verknüpft, bei dem sowohl die α -, als auch ε -Aminfunktion Fmoc-geschützt war. Somit konnten anschließend Y-förmig zwei weitere Sequenzen von **PII** / **PII₅₂₀₀** an die erste Kopie der Sequenz gekuppelt werden (**PII₂-K-PII**).

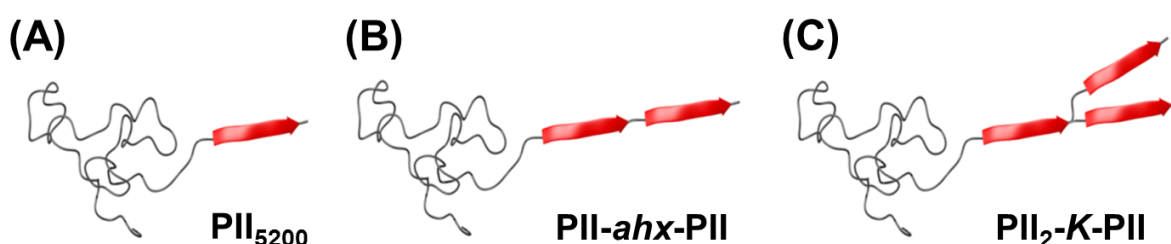


Abbildung 29. Schematische Darstellung der Konjugat-Architekturen mit variierendem Peptid-Block ((A) **PII₅₂₀₀**, (B) **PII-ahx-PII**, (C) **PII₂-K-PII**).

Zunächst sollte durch Beladung der Konjugate mit *m*-THPC die Zielstellung überprüft werden, durch Vervielfachung der Bindungsdomäne auch die Aufnahmekapazität zu steigern. Dafür wurde wie zuvor beschrieben *m*-THPC solubilisiert und die Konzentration an Wirkstoff in wässriger Lösung mittels Absorptionsspektroskopie bestimmt (**Tabelle 5**, vgl. Kapitel 3.3.1). Durch die Verdoppelung des Peptid-Blocks bei **PII-ahx-PII** wurde gleichzeitig eine Verdopplung der Beladungskapazität erreicht. Weiterhin wurde durch die Y-förmige Struktur mit drei Kopien des Peptids bei **PII₂-K-PII** eine nochmalige Erhöhung auf das 2.4-fache der Beladung von **PII** erreicht. Diese entsprach zwar nicht der zu erwartenden Verdreifachung, war aber möglicherweise auf eine kompaktere Struktur im Vergleich zum linearen und flexiblen **PII-ahx-PII** zurückzuführen. Dennoch war eine deutlich wahrnehmbare Steigerung festzustellen. Somit wurde das angestrebte Ziel erreicht, die Beladungskapazität pro Konjugat-Molekül mit *m*-THPC durch die Verwendung mehrerer Kopien der Bindungsdomäne maßgeblich zu erhöhen.

Tabelle 5. Gastmolekül-Beladungsgrade bei der Solubilisierung von *m*-THPC für die Konjugat-Architekturen mit verändertem Peptidsegment.

Peptid-Polymer-Konjugat	Konzentration <i>m</i> -THPC [mmol/mmol Konjugat]	Verhältnis <i>m</i> -THPC / Konjugat
PII₅₂₀₀	0.27	1 : 3.7
PII-ahx-PII	0.55	1 : 1.8
PII₂-K-PII	0.64	1 : 1.6

Auch die Konjugate mit Variationen des Peptidsegments wurden mittels dynamischer Lichtstreuung auf Aggregatbildung untersucht (**Tabelle 6**). Zunächst wurden wiederum Lösungen der Konjugate ohne *m*-THPC gemessen. Es zeigte sich, dass bei **PII-ahx-PII** im Vergleich zu **PII₅₂₀₀** der Radius mit steigender Größe des Peptidanteils ebenfalls zunahm, da sich hier gleichzeitig der hydrophobe Anteil des Konjugats vergrößert. **PII₂-K-PII** hingegen zeigte einen geringfügig niedrigeren hydrodynamischen Radius im Vergleich zu **PII-ahx-PII**. Dies war ein Indiz für eine dichtere Packung der hydrophoben Peptide aufgrund ihrer kompakten, verzweigten Struktur oder ein Wechsel in der Aggregatform.

Tabelle 6. Hydrodynamische Radien der Konjugat-Architekturen mit Variationen des Peptidsegments. Die Aggregatbildung der Konjugate wurde jeweils unbeladen (oben) und beladen (unten) mit *m*-THPC mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht.

	PII₅₂₀₀	PII-ahx-PII	PII₂-K-PII
– <i>m</i> -THPC	$R_h = 13 \pm 5 \text{ nm}$	$R_h = 35 \pm 2 \text{ nm}$	$R_h = 25 \pm 3 \text{ nm}$
+ <i>m</i> -THPC	$R_h = 120 \pm 4 \text{ nm}$	$R_h = 110 \pm 18 \text{ nm}$	$R_h = 65 \pm 7 \text{ nm}$

Ein anderes Bild zeigte sich, sobald die Konjugate jeweils mit ihrer maximalen Kapazität an *m*-THPC beladen wurden. Wie zuvor bei **PI – III**, nahmen die hydrodynamischen Radien der Aggregate durch die Hinzugabe des äußerst hydrophoben Wirkstoffs deutlich zu. Zusätzlich war eine klare Entwicklung hin zu kleineren Aggregaten mit steigendem Molekulargewicht der Konjugate zu erkennen. Im Vergleich der hydrodynamischen Radien des Konjugats **PII₂-K-PII**, welches das höchste Molekulargewicht aufwies, mit **PII₅₂₀₀**, wurde ein doppelt so großer Radius bei **PII₅₂₀₀** gemessen. Dennoch wurde in der Reihenfolge **PII₅₂₀₀**, **PII-ahx-PII** und **PII₂-K-PII** zunehmend mehr *m*-THPC pro Konjugat-Molekül solubilisiert, was

vermutlich auch zu einer geringeren Aggregationszahl führte. Im Fall von **PII₂-K-PII** besitzt das Konjugat zwar den größeren hydrophoben Peptidteil, dennoch bildete es in der Reihe die kleinsten Aggregate. In allen Fällen wurden statistisch jeweils ca. drei Peptidsegmente für die Solubilisierung eines Wirkstoffmoleküls benötigt. Dass **PII₂-K-PII** bereits über drei Peptidsegmente verfügt, könnte eine Erklärung dafür sein, dass es auch den niedrigsten Anstieg des hydrodynamischen Radius durch Beladung mit *m*-THPC aufwies. Wohlmöglich müssen sich im Fall von **PII₂-K-PII** die Konjugatmoleküle nur wenig im Aggregat neu organisieren, um alle Bindungsstellen des Wirkstoffs erfolgreich zu sättigen. Das Referenzsystem **PII** hingegen besitzt nur ein Peptidsegment und einen kleinen hydrophilen PEO-Block, wodurch starke Veränderungen in der Aggregatstruktur nötig sein könnten, um *m*-THPC zu sättigen und ausreichende kolloidale Stabilität zu gewährleisten. Daher könnte bei **PII** der Anstieg im hydrodynamischen Radius der Aggregate durch Beladung mit *m*-THPC besonders stark ausgefallen sein.

Des Weiteren galt es festzustellen, inwiefern sich die deutlich höhere Beladungskapazität der Konjugate durch die Erweiterung der Bindungsdomäne mit zusätzlichen Kopien der Aminosäuresequenz von **PII** auf die Freisetzungs- und Aktivierungskinetiken des Wirkstoffs auswirkt. Daher wurden die erweiterten Konjugat-Architekturen **PII-ahx-PII** und **PII₂-K-PII** im Vergleich zu **PII₅₂₀₀** ebenfalls zeitaufgelöst fluoreszenzspektroskopisch untersucht, nachdem BSA als Zielprotein im Überschuss zu den mit *m*-THPC beladenen Transportern zugesetzt wurde (**Abbildung 30**). Hier zeichnete sich der Trend ab, dass bei einer höheren maximalen Beladungskapazität der Konjugate auch die trans-Solubilisierung zum Protein beschleunigt ablief. Zwar erreichten alle drei Konjugate nach einer Messzeit von 18 h ein Plateau bei vergleichbaren Werten der Fluoreszenzemission, dennoch waren bezüglich der Steigung der Kurven innerhalb der ersten Stunden drastische Unterschiede sichtbar. Während **PII₅₂₀₀** nach vier Stunden Inkubationszeit ca. 50 % seiner finalen Emission (18 h) erreicht hatte, waren es bei **PII-ahx-PII** bereits rund 72 %. **PII₂-K-PII**, welches noch einmal eine ca. 30 % höhere Kapazität gegenüber **PII-ahx-PII** aufwies, zeigte nur in den ersten Stunden der Messung eine etwas beschleunigte Freisetzung. Nach etwa sieben Stunden decken sich die Kurven von **PII-ahx-PII** und **PII₂-K-PII** in ihrem Verlauf. Die Vergleichsprobe zu den Biokonjugaten in Form von Pluronic® F68 beladen mit *m*-THPC zeigte wieder eine sehr langsame Entwicklung der Fluoreszenz. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden

erreichte Pluronic® F68 lediglich 14 % der Emission von **PII₂-K-PII** nach 18 h. Die Steigung der Kurve blieb über die gesamte Messzeit sehr niedrig und erreicht am Ende nur 53 % der Intensität des Plateaus von **PII₂-K-PII**. Somit waren die Biokonjugate als Löslichkeitsvermittler deutlich schneller in der Lage, *m*-THPC auf das Zielprotein zu übertragen, als das Triblock-Copolymer.

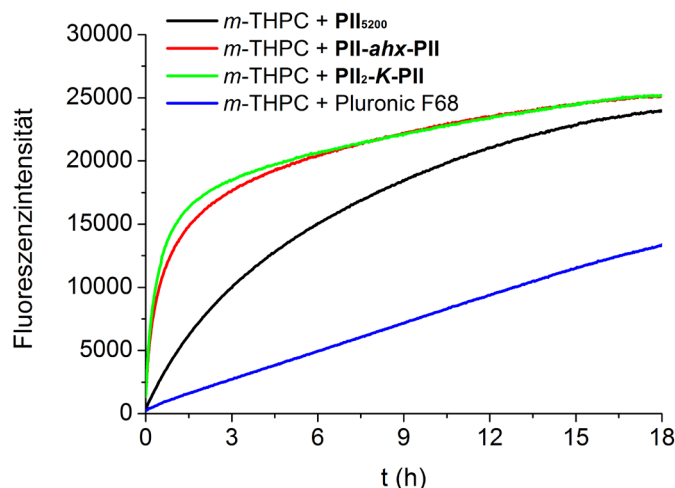


Abbildung 30. Fluoreszenz-Emission der verschiedenen Konjugat-Architekturen (**PII₅₂₀₀**, **PII-*ahx*-PII₅₂₀₀**, **PII₂-K-PII**) und Pluronic® F68 beladen mit *m*-THPC über die Zeit (t = 0 min entspricht der Zugabe von BSA, Bedingungen: Anregung = 417 nm, Emission = 653 nm, c[BSA] = 100 µM; c[*m*-THPC] = 0,1 µM).

Der Trend, dass mit steigender Beladungskapazität auch die trans-Solubilisierung zu BSA beschleunigt ist, lässt sich damit erklären, dass der Überschuss an Konjugat im Verhältnis zwischen Gastmolekül und Transporter mit zunehmendem Beladungsgrad abnimmt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass sich gleichzeitig mit zunehmend größerem Peptidsegment der hydrodynamische Radius verringert.^[244] Somit kann bei einem höheren Beladungsgrad und gleichzeitig geringerem hydrodynamischen Radius von einer deutlich schlechteren Abschirmung des Wirkstoffs durch die PEO-Hülle gegenüber dem Zielprotein BSA ausgegangen werden. Das würde den deutlich schnelleren Anstieg der Fluoreszenzemission bei **PII-*ahx*-PII** und **PII₂-K-PII** im Vergleich zu **PII₅₂₀₀** erklären.

3.4.3. Erweiterung der Konjugate um einem hydrophoben Block

Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass durch die Erweiterung des Peptidsegments durch zusätzliche Kopien der Bindungssequenz der Beladungsgrad der Konjugate mit *m*-THPC, sowie der Transfer und die Aktivierung des Gastmoleküls, stark beschleunigt werden kann. Nun besitzen Peptide allerdings den Nachteil, dass sich ihre Herstellung und Aufreinigung in großtechnischem Maßstab ausgesprochen aufwendig und teuer darstellt. Auch über Bakterienkulturen gewonnene, rekombinante Proteine müssen nachträglich an die entsprechenden Polymere konjugiert werden, wodurch die für medizinische Anwendungen notwendige Produktreinheit schwer zu erreichen ist. Daher sollten kostengünstige Alternativen zur Erweiterung der Peptidblocks um weitere Kopien der Bindungssequenz gefunden werden, welche dennoch einen hohen Beladungsgrad und effektive trans-Solubilisierung auf ein Zielmolekül erlauben. Dafür wurde ein Ansatz verfolgt, bei dem ein dritter, nicht spezifisch bindender aliphatischer Block neben dem Peptid- und PEO-Block von **PII** eingefügt werden sollte. Dadurch sollte ein stark hydrophober Kern im Inneren des Aggregats erzeugt werden, welcher potentiell als zusätzliches Reservoir für der Wirkstoff dient (**Abbildung 31**). Dafür wurde eine modifizierte Version von **PII** synthetisiert, welche *N*-terminal um eine lange C₁₆-Alkylkette in Form von Palmitinsäure erweitert wurde (**Pal-PII**).

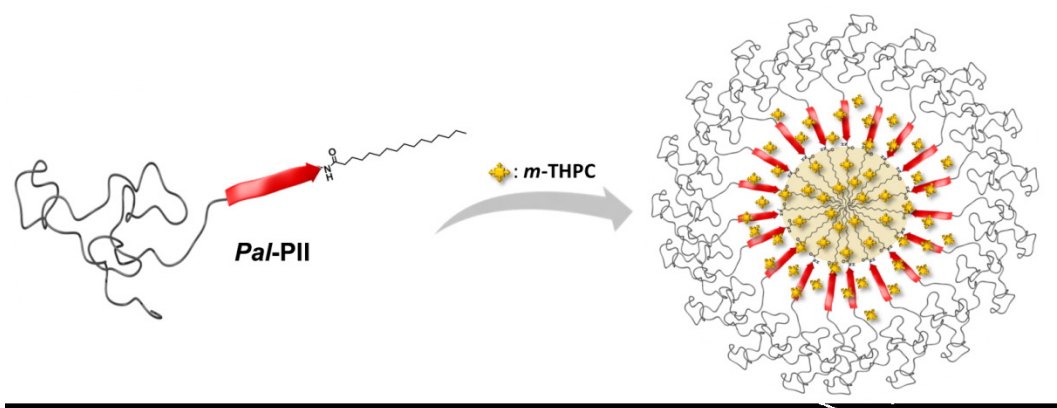


Abbildung 31. Schematische Darstellung der Aggregatstabilisierung durch ein *N*-terminal mit Palmitinsäure (**Pal-PII**) modifiziertes Konjugat.

Zunächst wurde *m*-THPC mit dem modifizierten Konjugat solubilisiert, um mögliche Effekte auf die Beladungskapazität durch die *N*-terminale Erweiterung festzustellen (**Tabelle 7**). Dabei zeigte sich, dass **Pal-P_{II}** mit einer Beladungskapazität von 0.86 mmol pro mmol Konjugat (Verhältnis 1 : 1.2 von *m*-THPC zu **Pal-P_{II}**) eine deutlich größere Menge an *m*-THPC solubilisiert hatte, als es bei **P_{II}** (0.31 mmol *m*-THPC pro mmol Konjugat) oder sogar **P_{II}₂-K-P_{II}** (0.64 mmol *m*-THPC pro mmol Konjugat) der Fall war. Somit konnte das erste maßgebliche Ziel der Erhöhung des Beladungsgrades erfolgreich realisiert werden. Zusätzlich wurde als Referenzsubstanz Palmitinsäure direkt an einen PEO-Block gekuppelt (**Pal-PEO**) und mit *m*-THPC beladen. Es war möglich, mit **Pal-PEO** eine ähnliche Menge des Wirkstoffs (0.37 mmol *m*-THPC pro mmol Konjugat) zu solubilisieren, wie im Fall von **P_{II}**. Die amphiphile Natur von **Pal-PEO** wird in wässrigen Medien wahrscheinlich ebenfalls zu Ausbildung von Aggregaten führen, in dessen hydrophoben Kern aus Palmitinsäureresten der Wirkstoff durch unspezifische Wechselwirkungen gespeichert werden kann. Damit entspricht **Pal-PEO** klassischen Block-Copolymer-Solubilisatoren.

Tabelle 7: Beladungsgrad mit *m*-THPC des Konjugats **Pal-P_{II}** mit *N*-terminalem Palmitinsäure-Rest im Vergleich zu **P_{II}**, sowie der Referenzsubstanz **Pal-PEO**.

Peptid-Polymer-Konjugat	Konzentration <i>m</i> -THPC [mmol/mmol Konjugat]	Verhältnis <i>m</i> -THPC / Konjugat
P_{II}	0.31	1 : 3.2
Pal-P_{II}	0.86	1 : 1.2
Pal-PEO	0.37	1 : 2.7

Auch hier wurden die *m*-THPC / Konjugat-Komplexe anschließend mittels dynamischer Lichtstreuung auf Aggregatbildung überprüft. Interessanterweise zeigte sich bei **Pal-P_{II}** nicht der bisher durchgehend zu beobachtende Effekt, dass die hydrodynamischen Radien der Aggregate stark anstiegen, sobald das Konjugat mit *m*-THPC beladen wurde. Für **Pal-P_{II}** war bereits ohne Beladung die Bildung von Aggregaten mit einem hydrodynamischen Radius von 43 ± 1 nm zu beobachten, was gut mit dem für **P_{II}** gemessenen Wert übereinstimmt ($R_h = 37 \pm 7$ nm). Allerdings unterschied sich die Aggregatgröße bei **Pal-P_{II}** im beladenen Zustand mit 41 ± 1 nm nur unwesentlich vom unbeladenen Zustand, während bei **P_{II}** ein Anstieg auf $R_h = 165 \pm 22$ nm festgestellt wurde. Gegebenenfalls wurden bereits

ohne den Wirkstoff aufgrund des sehr hydrophoben Palmitinsäure-Blocks starre, definierte Aggregate wie Mizellen ausgebildet, welche sich durch Einbau von *m*-THPC-Molekülen in den hydrophoben Kern nicht maßgeblich veränderten. Bei **PII** hingegen, welches ohne den dritten, hydrophoben Block weniger amphiphil war als **Pal-PII**, wurde möglicherweise durch die Bindung von *m*-THPC-Molekülen die Hydrophobie des Peptidsegments und die Tendenz zur Aggregation erhöht, was sich im Anstieg des hydrodynamischen Radius der Aggregate widerspiegelte. Wie bereits im Falle der Aggregate von **PI** und **PIII** mit *m*-THPC bewegte sich auch **Pal-PII** in einer Größenordnung, welche für passives *Targeting* über Ausnutzung des EPR-Effektes denkbar wäre (vgl. Kapitel 2.2.4).^[87]

Da **Pal-PII** sehr kleine Aggregate mit sehr hoher Beladung bildete, sollte der Effekt auf die Freisetzungskinetiken von *m*-THPC aus den Aggregaten aufgeklärt werden. Daher wurde wie bisher die Entwicklung der Fluoreszenz nach der Zugabe einer Lösung von BSA aufgezeichnet, wobei **Pal-PII** dem Konjugat **PII** ohne *N*-terminale Palmitinsäure gegenübergestellt wurde, sowie der Referenzverbindung **Pal-PEO** (Abbildung 32). Es zeigte sich bei **Pal-PII** ein sehr steiler Anstieg der Fluoreszenzemission, der bereits nach 3 h 70 % des Maximalwertes bei 18 h erreichte. Zu diesem Zeitpunkt wies die Fluoreszenz von *m*-THPC solubilisiert mit **PII** erst eine Intensität von ca. 30 % im Vergleich zum Wert nach 18 h Inkubation auf. Ebenso erreichte die Kurve von *m*-THPC / **Pal-PII** eine deutlich höhere Intensität nach 18 h, von der *m*-THPC / **PII** nur rund 71 % aufwies. Der Anstieg der Fluoreszenz von *m*-THPC solubilisiert mit der Referenzverbindung **Pal-PEO** hingegen stieg nach Zugabe von BSA nur sehr langsam an und erreichte nach einer Inkubationszeit von 18 h nur ca. 22 % der Intensität von *m*-THPC / **Pal-PII**.

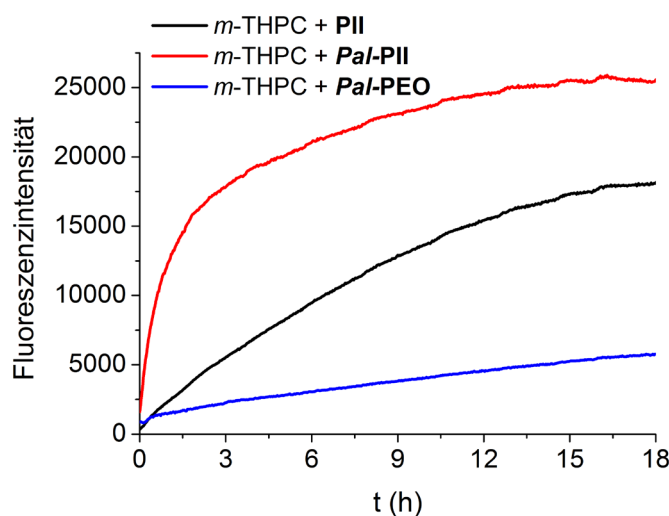


Abbildung 32. Entwicklung der Fluoreszenz-Emission von *m*-THPC gelöst mit **PII**, **Pal-PII** und **Pal-PEO** über die Zeit ($t = 0$ min entspricht der Zugabe von BSA, Bedingungen: Anregung = 417 nm, Emission = 654 nm, $c[\text{BSA}] = 100 \mu\text{M}$; $c[m\text{-THPC}] = 0,1 \mu\text{M}$).

Die sehr schnelle Freisetzung bei hoher Beladung und verhältnismäßig kleinen Aggregaten aus Wirkstoff und Konjugat lässt sich wiederum mit der hohen Gesamtoberfläche der Aggregate erklären, welche den Transfer des Wirkstoffs durch Stoßprozesse mit dem Zielprotein begünstigt. Dennoch wäre durch den sehr hydrophoben Palmitinsäure-Block am *N*-Terminus des Peptidsegments ein sehr stabiler hydrophober Kern der Aggregate zu erwarten, in welchem die Wirkstoffmoleküle sehr stark eingekapselt sein würden. Bei Copolymeren mit einem stark hydrophoben Block kann eine Verglasung des hydrophoben Kerns einer Mizelle auftreten, wodurch die dort gespeicherten Moleküle in ihrer Mobilität stark eingeschränkt und im Aggregat gefangen sind.^[245] Dieses Verhalten lässt sich für die Referenzsubstanz **Pal-PEO** beobachten, bei welcher der Wirkstoff nur sehr langsam durch die Zugabe von BSA aktiviert wurde. Möglicherweise wirkt allerdings das Peptidsegment zwischen hydrophilem PEO-Block und hydrophober Palmitinsäure bei **Pal-PII** als eine Art Phasentransferkatalysator, welcher eine effektive Überwindung der Grenzfläche zwischen hydrophobem und hydrophilen Block und die Übertragung auf das Protein vermittelt. Somit war hier eine sehr schnelle Aktivierung von *m*-THPC möglich, während die Fluoreszenzemission von *m*-THPC solubilisiert mit **Pal-PEO**, ähnlich wie schon bei Pluronic® F68 (vgl. Kapitel 3.3.4), sehr langsam anstieg. Damit wären Nachteile klassischer, amphiphiler Blockcopolymerer als Löslichkeitsvermittler überwindbar, welche als Matrix-

oder Reservoirsysteme auf unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Makromolekül beruhen, was eine sehr interessante Perspektive für die Weiterentwicklung polymerbasierter *Drug-Delivery*-Systeme darstellen kann.

3.5. Schaltbare Solubilisatoren⁶

Bisher konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Peptid-PEO-Konjugate *m*-THPC effektiv in wässriger Lösung halten und sich die Geschwindigkeit der Freigabe des Gastmoleküls über Variationen in der Aminosäuresequenz oder eine veränderte Konjugat-Architektur gezielt beeinflussen lässt. Bei hochentwickelten und spezialisierten *Drug-Delivery*-Systemen (DDS) kann allerdings zusätzlich eine schaltbare Funktion für die gezielte Freisetzung des Gastmoleküls vom Trägersystem eingebaut werden. Dadurch soll der Wirkstoff an einem spezifischen Ort im Körper, wie in einem bestimmten Organ oder einem Tumor, abgegeben werden, um zielgerichtet Krankheiten therapieren zu können.^[246,247] Damit können geringere Dosen des Wirkstoffs denselben therapeutischen Effekt erzielen, wodurch Nebenwirkungen deutlich verringert werden können. Die Schaltung der Transporter für die Freisetzung des Gastmoleküls kann dabei durch die im Zielgewebe herrschenden Bedingungen gesteuert sein, indem z. B. der niedrige pH-Wert in Krebsgewebe oder das reduktive Milieu im Zytoplasma einer Zelle genutzt wird. Andererseits können auch externe Stimuli genutzt werden, wie die Photoschaltung durch Bestrahlung mit Licht oder lokale Hyperthermie bei thermoresponsiven Materialien. Ziel des folgenden Abschnitts war es daher, diese Konzepte auf Peptid-PEO-Konjugate als Wirkstofftransporter anzuwenden, um spezifische Solubilisatoren zu erhalten, bei denen eine beschleunigte Freisetzung des Wirkstoff-Gastmoleküls über einen externen Stimulus ausgelöst werden kann.

⁶ Die Bibliotheksynthese, das Screening sowie die Synthese der Konjugate in diesem Abschnitt wurden von Sara Vigne im Rahmen ihrer Master-Arbeit (2012) durchgeführt.^[255]

3.5.1. Design der Peptidbibliothek

Die Herangehensweise, bestehende Bindungsdomänen für *m*-THPC aus dem ersten *Screening* einfach mit einem schaltbaren Linker-Molekül in ihrer Aminosäuresequenz zu versehen, kann zur Folge haben, dass die Bindungseigenschaften und die Freisetzungskinetik des Solubilisators in unvorhersehbarer Weise beeinträchtigt werden. Daher wurde eine neue, zweite Generation der Bibliothek synthetisiert, um eine schaltbare Freisetzung von solubilisiertem *m*-THPC zu ermöglichen.

Um die Schaltbarkeit der Bindungsdomänen zu erreichen, wurde ein neuer Baustein, welcher eine Disulfid-Brücke enthält, in die Aminosäuresequenzen eingebunden (**Abbildung 33**). Die Disulfid-Brücke lässt sich unter reduktiven Bedingungen in zwei Thiole spalten, so dass die Bindungsdomäne in zwei Peptidfragmente geteilt wird, um die Affinität zum Gastmolekül herabzusetzen. Dieser wurde in Form einer unnatürlichen Aminosäure auf Basis von Cystamin in die Peptidbibliothek eingebaut.⁷ Durch die Einführung einer Fmoc-Schutzgruppe an einer der primären Amin-Funktionen des Cystamins und der Umfunktionalisierung der zweiten zu einer Carboxyl-Gruppe über eine Amidierung mit Bernsteinsäure-Anhydrid wurde volle Kompatibilität des Disulfid-Bausteins zur Festphasen-Peptidsynthese erreicht.^[248] Disulfid-Brücken eignen sich besonders für schaltbare Transportsysteme zur kontrollierten Freisetzung von Gastmolekülen, da sie unter den oxidativen Bedingungen des Blutplasmas stabil sind, interzellulär jedoch schnell gespalten werden. Dies geschieht durch deutlich höhere Glutathion-Konzentrationen im Zellinneren, welche reduktiv wirken.^[249] Daher können polymere Wirkstofftransporter, welche Disulfid-Brücken enthalten, nach der Aufnahme in die Zellen abgebaut und somit der Wirkstoff gezielt freigesetzt werden.^[250-252]

⁷ Der Fmoc-geschützte Cystamin-Linker (CDS) wurde freundlicherweise von Dr. Daniela Ponader und Prof. Dr. Laura Hartmann vom Max-Planck-Institut für Kolloide und Grenzflächen in Potsdam Golm bereitgestellt.

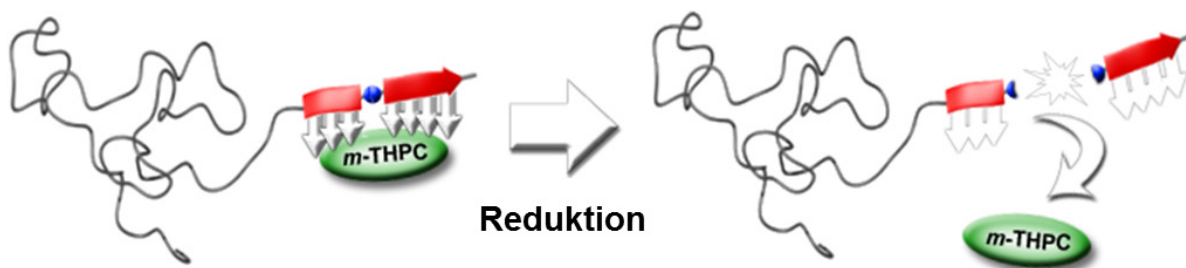


Abbildung 33. Schematische Darstellung des Prinzips der Freisetzung von *m*-THPC durch die Spaltung der peptidischen Bindungsdomäne.

Bei der Bibliothek handelte es sich wiederum um eine durch das *Split&Mix*-Verfahren randomisierte 7mer Peptidbibliothek, nur dass in diesem Fall zwischen den Positionen vier und fünf der Sequenz (Axx₄ und Axx₅) der Disulfid-Linker gekuppelt wurde (**Abbildung 34**). Da sich jedoch bei dem *Screening* der ersten Generation der Bibliothek (**Bib1**) gegen *m*-THPC die zentrale Rolle des aromatischen Phenylalanins herauskristallisiert hat, wurden zwei weitere aromatische Aminosäuren (Tyrosin und Tryptophan) in der Bibliothek verwendet. Diese ersetzen das polare, ungeladene Serin und das flexible Glycin, welche nur in sehr geringer Anzahl im ersten *Screening* gefunden wurden. Weiterhin wurde wieder hydrophob-aliphatisches Leucin, polar-neutrales Glutamin, sowie positiv geladenes Arginin und negativ geladene Glutaminsäure eingebaut, um wiederum eine Bibliothek mit rund 8.2×10^5 verschiedenen Aminosäuresequenzen zu erhalten. Somit diente die **Bib2** nicht nur der Einführung einer Funktion für Schaltbarkeit, sondern durch die Auswahl der Aminosäuren auch als zweite Generation der ursprünglichen Bibliothek **Bib1**. Insbesondere die Eignung der verschiedenen aromatischen Aminosäuren für die Bindung zu *m*-THPC sollte hierbei evaluiert werden. Wie zuvor wurde eine mit Bromcyan spaltbare Linker-Sequenz (Gly-Gly-Met) C-terminal an die Peptide gekuppelt (vgl. Kapitel 3.1.2).

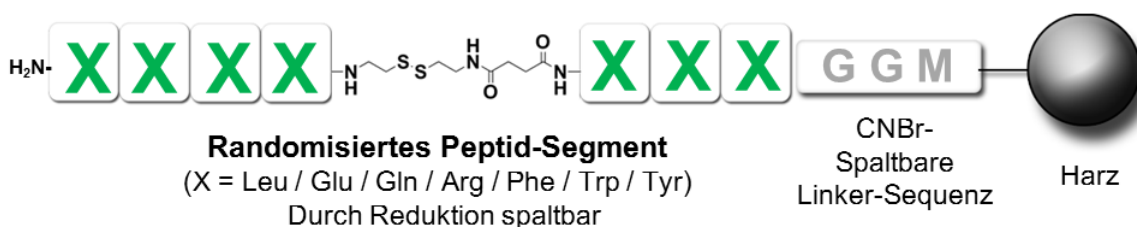


Abbildung 34. Aufbau der immobilisierten Peptidbibliothek **Bib2** mit randomisiertem Peptidsegment und Disulfid-Linker, sowie der mit Bromcyan spaltbaren Linker-Sequenz (GGM).

Durch die Reduktion der Disulfid-Brücke zu Thiolen kann dann die Bindungsdomäne in zwei Teile gespalten werden, wodurch ein kleines Peptidfragment entsteht und nur drei Aminosäurereste am PEO-Block verbleiben. Dadurch soll die Bindungsaffinität zum Gastmolekül herabzusetzen und eine schnellere Freisetzung erreicht werden. Die Spaltung des Peptids erscheint dabei vielversprechender als die Positionierung des Linkers z. B. zwischen Peptid und PEO-Block. Bei einer Abspaltung des gesamten Peptidsegments vom wasserlöslichen PEO-Block würde es voraussichtlich weiterhin an *m*-THPC haften und mitsamt des unlöslichen Wirkstoffs ausfallen. Hingegen sollte durch die Spaltung der Bindungsdomäne selbst diese gestört und somit die Freisetzung des Wirkstoffs erleichtert werden.

3.5.2. *Screening* und Sequenzierung

Nach der Synthese und vollen Entschützung der Aminosäureseitenketten wurde die Bibliothek mit *m*-THPC inkubiert (vgl. Kapitel 3.2). Auch hier zeigte sich unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Anreicherung des Wirkstoffs an einzelnen Kügelchen (vgl. Kapitel 7.1, **Abbildung 67**), welche manuell isoliert wurden. Nach Abspaltung der Peptide vom festen Träger wurde sie mittels MALDI-ToF-MS/MS-Spektrometrie sequenziert und die Ergebnisse in **Tabelle 20** (vgl. Kapitel 7.2) zusammengefasst.

Wie bereits beim *Screening* der **Bib1** gegen *m*-THPC zeigte die Sequenzierung von rund 30 positiven Treffern eine starke Anreicherung aromatischer Aminosäuren (Phe, Tyr, Trp) in den gefundenen Sequenzen (**Abbildung 35**). Im direkten Vergleich zeigte sich, dass Phenylalanin als hydrophober Vertreter am besten für die Bindung von *m*-THPC geeignet war, da es an allen Positionen der Peptidkette überdurchschnittlich oft gefunden wurde (**Abbildung 35B**). Im Bereich der C-terminalen Trimer-Sequenz zwischen PEO-Block und Disulfid-Linker wurden fast ausschließlich aromatische Aminosäuren gefunden (**Abbildung 35D**). Bei der N-terminalen Tetramer-Sequenz hingegen waren auch verstärkt polare ungeladene bzw. negativ geladene Aminosäurereste zu finden (**Abbildung 35C**). Insbesondere nahe des N-Terminus war die negativ geladene Glutaminsäure angereichert, während es in Richtung des Disulfid-Linkers zunehmend durch neutral-polares Glutamin verdrängt wurde. Des Weiteren fand sich nahe des Disulfid-Linkers zunehmend Leucin (Axx₂-Axx₄), da es an dieser Position anscheinend von besonderer Bedeutung für hydrophobe Wechselwirkungen mit

m-THPC war. Einzig Arginin wurde selten gefunden, was dafür spricht, dass positiv geladene Aminosäuren nicht von großem Nutzen für die nichtkovalente Bindung von *m*-THPC sind.

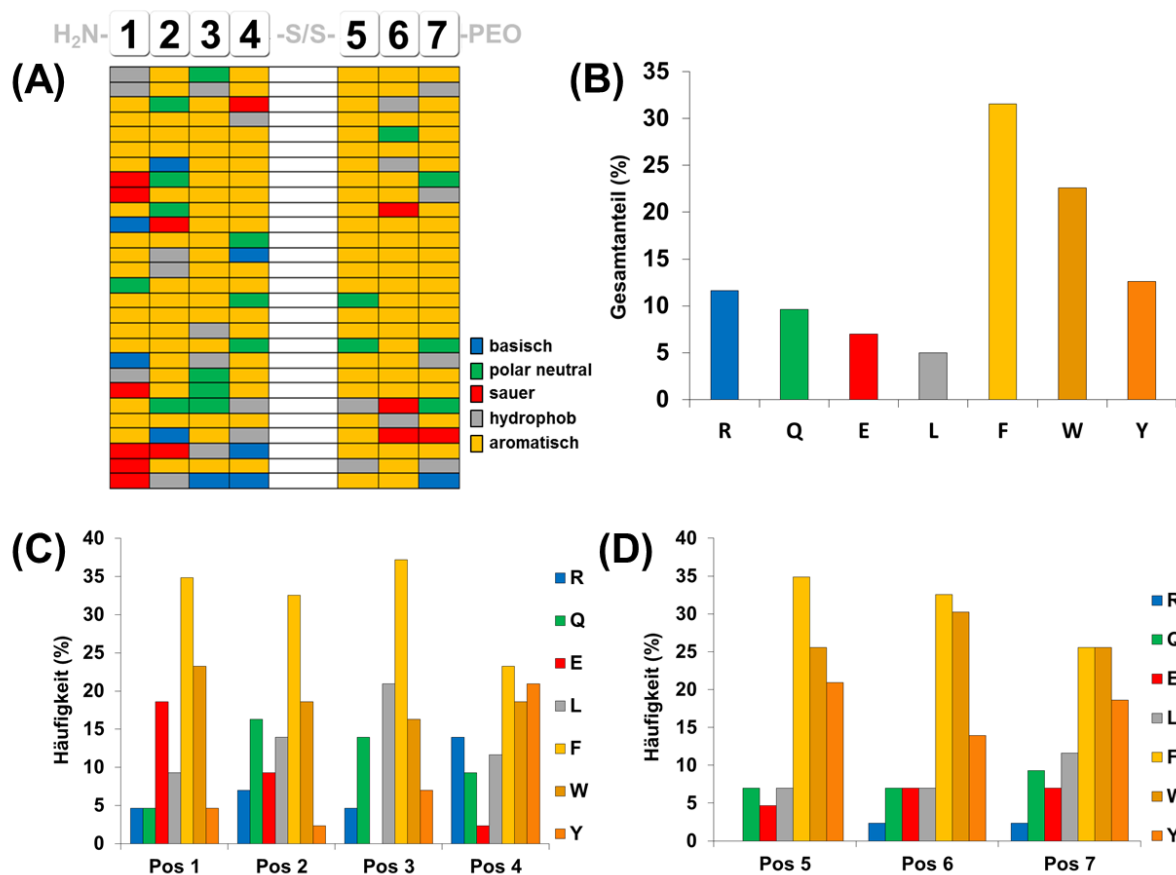


Abbildung 35. Blockdiagramm der gefundenen Aminosäuresequenzen (A) und Säulendiagramm des prozentualen Gesamtanteils der jeweiligen Aminosäuren (B), sowie der prozentualen Häufigkeit an jeder Position im N-terminalen Tetramer-Segment (C, Axx₁-Axx₄) und C-terminalen Trimer-Segment (D, Axx₅-Axx₇) gefunden im *Screening* der **Bib2** gegen *m*-THPC.

Aus den Ergebnissen der Sequenzierung wurden zwei der Peptide für die weitere Untersuchung ausgewählt (Abbildung 36). Beide Sequenzen stimmen sehr gut mit den Ergebnissen des ersten *Screenings* (Bib1) überein und bestehen aus den offensichtlich für die Wechselwirkung mit *m*-THPC relevanten Aminosäuren Phenylalanin, Leucin und Glutamin. Auch diese Binder wurden als Peptid-PEO-Konjugate mittels Festphasenpeptidsynthese unter Nutzung eines mit PEO (3.2×10^3 g/mol) vorbeladenen PAP-Harzes synthetisiert. Dabei setzte sich das Konjugat **PI-ds** aus einem C-terminalen Phenylalanin-Trimer und der N-terminalen Tetramer-Sequenz Leu-Trp-Gln-Tyr zusammen ($c\text{LogP} = 5.59 \pm 0.95$). **PII-ds**

hingegen enthielt insgesamt etwas weniger aromatische Aminosäuren, dafür ist es mit drei aliphatischen Leucin-Resten deutlich hydrophober ($c\text{LogP} = 8.08 \pm 0.95$).

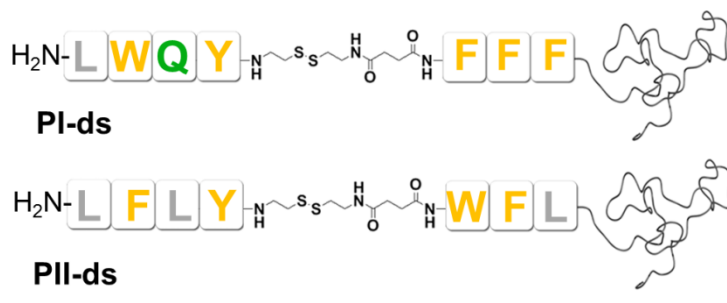


Abbildung 36. Die Aminosäuresequenzen der beiden selektierten Konjugate **PI-ds** und **PII-ds**.

3.5.3. Solubilisierung von *m*-THPC mit spaltbaren Transportern

Anschließend wurden die Konjugate **PI-ds** und **PII-ds** auf ihre Effektivität als Löslichkeitsvermittler für *m*-THPC getestet. Dafür wurde wie bisher eine Lösung von *m*-THPC (1 g/L, 1.47 $\mu\text{mol/L}$) in Ethanol mit wässrigen Lösungen (pH 7.0) der jeweiligen Konjugate (1.47 $\mu\text{mol/L}$) gemischt und gefriergetrocknet (vgl. Kapitel 3.3.1). Die Rückstände wurden in Wasser aufgenommen und ungelöstes *m*-THPC abzentrifugiert. Anschließend wurde die Konzentration an Wirkstoff in den Überständen mittels UV/Vis-Absorptionsspektroskopie bestimmt (**Tabelle 8**, **Abbildung 37**). Das hydrophobe Konjugat **PII-ds** zeigte dabei wie zu erwarten mit 0.56 mmol *m*-THPC pro mmol Konjugat (Verhältnis 1 : 1.8 *m*-THPC zu **PII-ds**) einen deutlich höheren Beladungsgrad als das hydrophilere **PI-ds** (0.24 mmol / mmol Konjugat, Verhältnis 1 : 4.1 *m*-THPC zu **PI-ds**). Damit lagen die Beladungsgrade der schaltbaren Konjugate im Bereich des Konjugats **PII** (0.31 mmol *m*-THPC pro mmol Konjugat, Verhältnis 1 : 3.3), welches aus dem Screening der **Bib1** stammte. Der flexible Cystamin-Linker wirkte sich also nicht negativ auf die Beladung aus. Der Unterschied zwischen den beiden schaltbaren Konjugaten (**PI-ds** und **PII-ds**) bezüglich des Beladungsgrades ließ sich dabei möglicherweise auf den polaren Glutamin-Rest auf Position Axx₃ im *N*-terminalen Tetramer-Segment von **PI-ds** zurückführen. Die Sequenz von **PII-ds** bestand nur aus aromatischen und hydrophoben

Aminosäuren. Damit war die Aggregation in einem hydrophoben Kern mit dem Wirkstoff begünstigt, während das Glutamin bei **PI-ds** dahingehend eher störend wirken könnte.

Tabelle 8: Beladungsgrad der spaltbaren Konjugate **PI-ds** und **PII-ds** mit *m*-THPC.

Peptid-Polymer-Konjugat	Konzentration <i>m</i> -THPC [mmol/mmol Konjugat]	Verhältnis <i>m</i> -THPC / Konjugat
PI-ds	0.56	1 : 1.8
PII-ds	0.24	1 : 4.1

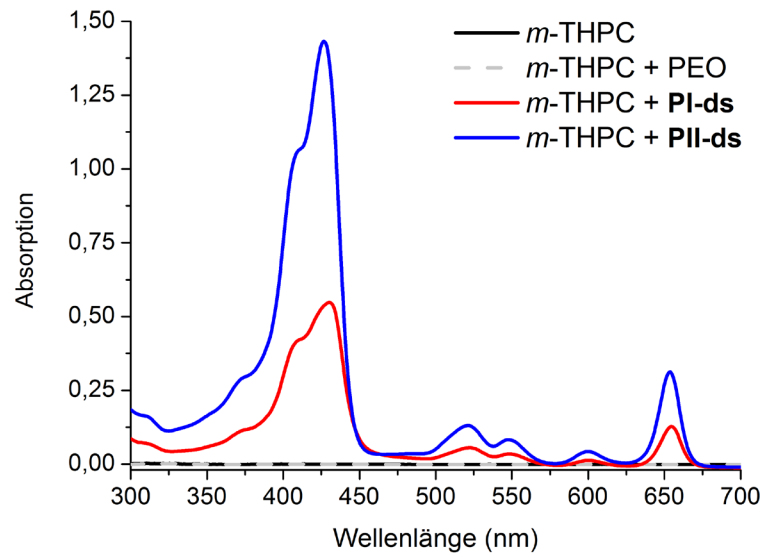


Abbildung 37. UV/Vis-Absorptionsspektren des mittels **PI-ds** und **PII-ds** solubilisierten *m*-THPC in Wasser, sowie Kontrollexperimente.

3.5.4. Bindungsstudien zwischen *m*-THPC und spaltbaren Transportern

Da sich ein starker Unterschied bezüglich des Beladungsgrades mit *m*-THPC für beide spaltbaren Konjugate herausgestellt hatte, wurden wiederum *in silico* Bindungsstudien durchgeführt.⁸ Dafür wurden dreidimensionale Modelle der idealisierten 1 : 1 Komplexe aus Wirkstoff und der jeweiligen Peptidsequenz (unter Vernachlässigung des PEO-Blocks) in der Software *CORINA* erstellt. Diese wurden anschließend mit Hilfe des MAB-Kraftfelds des Software-Paketes MOLOC^[227] energieminiert, um die nichtkovalenten Wechselwirkungen von Gastmolekül und Träger auf molekularer Ebene besser verstehen zu können (**Abbildung 38**).

In beiden Fällen zeigte sich, dass eine Konformation des Peptids energetisch von Vorteil scheint, bei der je ein Segment von oben und von der Unterseite an den scheibenförmigen Wirkstoff bindet. Ermöglicht wird das durch den langen, flexiblen Disulfid-Linker, der im Gegensatz zu einem Peptidrückgrat ausreichend Freiheitsgrade für diese Konformation zur Verfügung stellte. Zahlreiche hydrophobe Wechselwirkungen, besonders parallele, versetzt parallele und T-förmige π - π -Wechselwirkungen zwischen aromatischen Aminosäureresten und dem Tetrapyrrol-Gerüst bzw. den äußeren Hydroxyphenyl-Substituenten von *m*-THPC schienen die Haupttriebkraft für die Bindung zu sein. Zusätzlich wurde häufig Amid- π -Stapelung zwischen *m*-THPC und dem Peptidrückgrat gefunden.

⁸ *In silico* Bindungsstudien der Peptidsegmente der Konjugate **PI-ds** und **PII-ds** mit einer C-terminalen EO-Einheit wurden von Tiziana Masini und Prof. Dr. Anna K. H. Hirsch der Rijksuniversiteit Groningen (NL) durchgeführt.

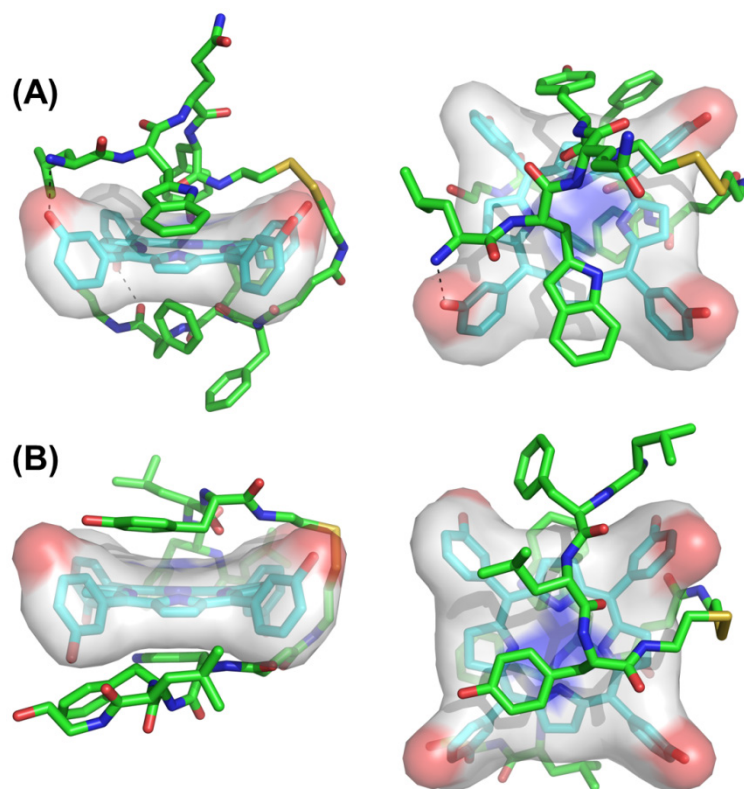


Abbildung 38. Bindungsstudien der Wechselwirkungen zwischen *m*-THPC (als blaue Stäbe und graue *van-der-Waals*-Oberfläche dargestellt) und der Peptid-Segmente der Biokonjugate **PI-ds** und **PII-ds** (als grüne Stäbe dargestellt) als idealisierte 1:1-Komplexe: **(A) PI-ds/*m*-THPC**, **(B) PII-ds/*m*-THPC** in Seitenansicht (links) und Draufsicht (rechts). Die Abbildungen wurden in *PYMOL* erzeugt.

Trotz der klammerförmigen Peptidstrukturen waren dank des zentralen, flexiblen Disulfid-Linkers weder inter- noch intramolekulare Kollisionen oder unvorteilhafte Konformationen festzustellen. Die berechneten Modelle für **PI-ds** und **PII-ds** legten die Vermutung nahe, dass Wasserstoff-Brücken zwischen den Phenol-Gruppen von *m*-THPC und den Peptiden beide Partner zusätzlich miteinander verbrücken. Waren hydrophobe Reste nicht in die direkte Bindung zu *m*-THPC involviert, so wurden sie in intramolekulare Wechselwirkungen innerhalb der Peptidkette eingebunden, welche den Gesamtkomplex weiter stabilisierten (z.B. für **PI-ds**: Phe₅). Insgesamt zeigte sich ein deutlich kompakterer Komplex zwischen *m*-THPC und **PII-ds** mit einer stärkeren Faltung des Peptids um den Wirkstoff, als es für **PI-ds** der Fall war. Gerade das hydrophile Glutamin (Gln₃) in der Sequenz von **PI-ds** ist dem hydrophoben *m*-THPC abgewandt. Ausgehend von der Annahme, dass auch die spaltbaren Solubilisatoren Aggregate mit dem Wirkstoff ausbilden, liegt die Vermutung nahe, dass gerade die sehr

kompakte Struktur der **PII-ds**/*m*-THPC-Komplexe ein möglicher Grund für die deutlich höhere Aufnahmekapazität im Vergleich zu **PI-ds** sein könnte.

3.5.5. Aggregatbildung zwischen *m*-THPC und spaltbaren Transportern

Ob wie im Fall der nicht-spaltbaren Transporter für *m*-THPC (vgl. Kapitel 3.3.3, **Tabelle 2**) die Solubilisierung des Photosensibilisators wieder durch die Ausbildung von Aggregaten begleitet wird, sollte im Anschluss mittels dynamischer Lichtstreuung geklärt werden. Dabei war es auch von Interesse, ob sich die Spaltung des Disulfid-Linkers auf die Aggregatgröße auswirkt. Außerdem war zu untersuchen, ob sich die kompaktere Struktur von **PII-ds** mit *m*-THPC, welche sich in den Bindungsstudien gezeigt hat, auf die Ausbildung von Aggregaten bzw. deren Größe auswirkt. Ebenso sollte der Einfluss des hydrophileren *N*-terminalen Tetramer-Segments von **PI-ds** untersucht werden.

Tabelle 9. Hydrodynamische Radien der spaltbaren Konjugate **PI-ds** und **PII-ds**, jeweils unbeladen und beladen mit *m*-THPC, sowie beladen und reduziert mit TCEP, bestimmt mittels dynamischer Lichtstreuung.

	PI-ds	PII-ds
– <i>m</i> -THPC	$R_h = 30 \pm 4 \text{ nm}$	$R_h = 34 \pm 1 \text{ nm}$
+ <i>m</i> -THPC	$R_h = 198 \pm 12 \text{ nm}$	$R_h = 91 \pm 6 \text{ nm}$
+ <i>m</i> -THPC + TCEP	$R_h = 162 \pm 14 \text{ nm}$	$R_h = 46 \pm 1 \text{ nm}$

Daher wurden jeweils wässrige Lösungen der Konjugate vor und nach der Beladung mit *m*-THPC sowie vor und nach der Spaltung durch Reduktion mit *Tris*(2-Carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid (TCEP) mittels DLS untersucht (**Tabelle 9**). Die Analyse zeigte, dass beide Konjugate bereits Aggregate ($R_h = 30 - 34 \text{ nm}$) vor der Beladung mit dem Wirkstoff ausbilden. Dies ist im Hinblick auf die eher hydrophoben Aminosäuresequenzen nicht weiter verwunderlich, da es zu einer amphiphilen Natur der beiden Peptid-PEO-Konjugate führte. Wiederrum stiegen die hydrodynamischen Radien der Aggregate durch die Beladung mit *m*-THPC noch einmal deutlich an. Für **PI-ds** wurde nach der Beladung ein hydrodynamischer Radius von $198 \pm 12 \text{ nm}$, für **PII-ds** von $91 \pm 6 \text{ nm}$ gefunden. Des Weiteren zeigte sich durch die reduktive Spaltung der Disulfid-Brücke des Komplexes von **PI-ds** mit *m*-THPC nur eine geringe Verminderung der Aggregatgröße

($R_h = 162 \pm 14$ nm), während unter gleichen Bedingungen das Aggregat von **PII-ds** deutlich an Größe verliert ($R_h = 46 \pm 1$ nm).

PI-ds zeigte in den Bindungsstudien eine weniger kompakte Struktur und das Herausstehen des Gln₃-Restes in das umgebende Lösemittel. Damit lässt sich möglicherweise auch der größere hydrodynamische Radius in der DLS erklären, da eine geringere Packungsdichte im hydrophoben Kern möglich sein könnte. Gleichzeitig scheint Gln₃ sich störend auf die Bindung zu wirken, da bei **PI-ds** ein geringerer Beladungsgrad zu verzeichnen war. **PII-ds** hingegen zeigte eine kompaktere Struktur und kleinere Aggregate in der DLS, war aber dennoch in der Lage, mehr *m*-THPC zu solubilisieren. Da dessen Peptidsequenz ausschließlich aus aromatischen und hydrophoben Aminosäuren besteht, ist wahrscheinlich eine deutlich dichtere Packung des hydrophoben Kerns der Aggregate möglich. Nach der Spaltung der Konjugate mit TCEP war bei **PII-ds** in der DLS ein stärkerer Effekt auf die Größe der Aggregate zu beobachten als bei **PI-ds**. Denkbar wäre, dass das Abspalten des *N*-terminalen Tetramer-Segments zu einer Verringerung des hydrodynamischen Radius führte, da dadurch mehr Freiheitsgrade für die Anordnung im hydrophoben Kern zur Verfügung stehen.

3.5.6. Freisetzung von *m*-THPC unter Spaltung der Transporter

Das Einschließen des Photosensibilisators in Aggregaten mit den spaltbaren Peptid-PEO-Konjugaten, wie es durch die dynamische Lichtstreuung nachgewiesen wurde, wird voraussichtlich auch in dem vorliegenden Fall den kompletten Verlust der Aktivität des Wirkstoffs bezüglich der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch intermolekulares Quenching zur Folge haben (vgl. Kapitel 3.3.5). Auch sollte überprüft werden, ob sich wie zuvor *m*-THPC auf BSA als Zielprotein trans-solubilisieren lässt, wodurch die lokale Konzentration im Kern der Aggregate nachlässt und die Fluoreszenz ansteigt. Schlussendlich galt es aufzuklären, welchen Einfluss eine Spaltung der Konjugate durch Reduktion der Disulfid-Brücke auf die Freisetzungs- und Aktivierungskinetik hat.

Kontrollversuche mit dem nicht-spaltbaren Triblock-Copolymer Pluronic[®] F68 beladen mit *m*-THPC zeigten allerdings, dass die Zugabe von Reduktionsmittel, gefolgt von einem Überschuss an BSA, bereits einen Einfluss auf die Fluoreszenzkinetiken hat. Da sich in der Struktur des Copolymers keine Disulfidbrücke findet und es somit nicht durch

Reduktionsmittel beeinflusst werden sollte, wird der Grund für den Effekt in der Reduktion von Disulfidbrücken von BSA gelegen haben, welche zur Stabilität der Tertiärstruktur des Proteins beitragen. BSA verfügt über insgesamt 35 Cystein-Reste, von denen 34 über Disulfid-Brücken verbunden sind. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse für gespaltene und nicht gespaltene Konjugate zu gewährleisten, wurde BSA daher zunächst mit TCEP reduziert und die Thiolgruppen der freien Cysteine mit Iodessigsäure alkyliert (**Abbildung 39**). Somit konnte im Folgenden eine Disulfid-Bildung durch das Protein ausgeschlossen werden. Mit dieser Modifikation des Zielproteins wurde kein weiterer Einfluss des Reduktionsmittels auf die Fluoreszenzkinetiken des nicht-spaltbaren Referenzsystems Pluronic® F68 bei Kontrollexperimenten festgestellt (vgl. Kapitel 6.10, **Abbildung 58**).

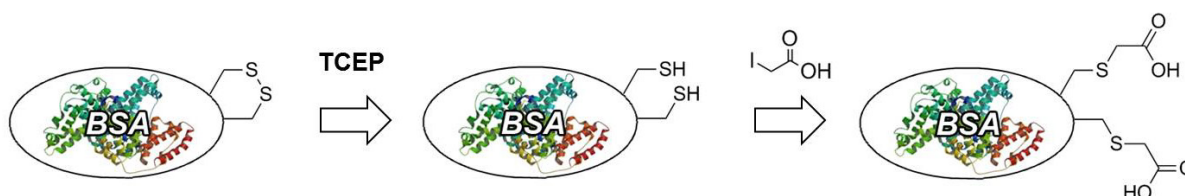


Abbildung 39. Prinzip der Alkylierung von BSA: Zunächst werden alle Disulfid-Brücken mit TCEP reduziert, um die freien Thiol-Gruppen anschließend mit Iodessigsäure zu Carbonsäuren umzufunktionalisieren, was eine oxidative Rückreaktion zu Disulfiden verhindert.

Anschließend konnten die Fluoreszenzkinetiken des Wirkstoffs *m*-THPC, welcher mit den spaltbaren Konjugaten **PI-ds** und **PII-ds** solubilisiert wurde, gemessen werden (**Abbildung 40**). Dafür wurde jeweils ein Aliquot der beiden Proben (0.1 μ M *m*-THPC) mit TCEP (5 mM) reduziert und ein Überschuss alkyliertes BSA (10 μ M) hinzugegeben. Parallel wurden Referenzproben von **PI-ds** und **PII-ds** mit *m*-THPC präpariert, welche nur Puffer ohne Reduktionsmittel, aber eine identische Menge alkyliertes BSA enthielten.

Im Vergleich der Kinetiken der beiden Konjugate ohne Reduktion mit TCEP war bereits zu erkennen, dass die Geschwindigkeit der Freisetzung bzw. der Aktivierung des Wirkstoffs stark von der eigentlichen Aminosäuresequenz der Konjugate abhing. So erreichte die Aktivität des *m*-THPCs gebunden im Aggregat mit **PII-ds** bereits innerhalb der ersten Stunde

der Messung 73 % des Maximalwerts, während der Anstieg nach vier Stunden sehr stark nachließ. Hingegen war die Aktivierung bei **PI-ds** deutlich langsamer und ein Anstieg über die kompletten 18 h zu beobachten. Des Weiteren erreichte die Fluoreszenz des mit **PI-ds** solubilisierten *m*-THPCs nur rund 73 % des Maximalwertes nach 18 h im Vergleich zu **PII-ds**. Das könnte eine Konsequenz aus der höheren Aggregatgröße sein, welche in der dynamischen Lichtstreuung beobachtet wurde (vergl. Kapitel 3.3.5.). Ebenso war die Stabilisierung der Grenzfläche zwischen hydrophoben Kern und Lösemittel durch den dem Lösemittel zugewandten Glutamin-Rest von **PI-ds** denkbar, wie es die Bindungsstudien nahelegten.

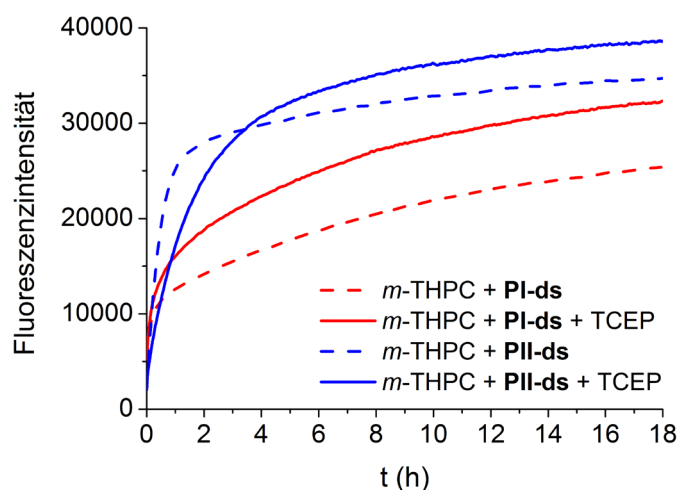


Abbildung 40. Entwicklung der Fluoreszenz als Funktion der Zeit von solubilisiertem *m*-THPC mit **PI-ds** (rot) und **PII-ds** (blau) nach der Zugabe von alkylisiertem BSA, jeweils vor (Striche) und nach (Linie) der Reduktion der Konjugate mit TCEP. ($t = 0$ min entspricht der Zugabe von BSA, Bedingungen: Anregung = 417 nm, Emission = 653 nm, $c[\text{BSA}] = 100 \mu\text{M}$; $c[\text{m-THPC}] = 0.1 \mu\text{M}$).

Im Vergleich der mit TCEP reduzierten zu den unbehandelten Proben konnte ein deutlicher Einfluss der Reduktion auf den Kurvenverlauf festgestellt werden. HPLC-Kontrollexperimente bestätigten dabei die Vollständigkeit der Spaltung (am Beispiel von **PII-ds**) unter vergleichbaren Bedingungen schon bei der Zugabe von deutlich geringeren Mengen an TCEP (vgl. Kapitel 6.11). In den Fluoreszenzkinetiken waren für die beiden Konjugate zwei grundsätzlich unterschiedlich Verhaltensweisen zu beobachten, wobei die Polarität des *N*-terminalen Tetramer-Segments, welches durch Reduktion des Disulfid-Linkers von Konjugat abgespalten wurde, eine entscheidende Rolle zu spielen schien. Für **PI-ds** war

wie zu erwarten eine insgesamt beschleunigte Freisetzung bzw. Aktivierung durch die Reduktion der Probe festzustellen. Durch die trans-Solubilisierung zu alkylisiertem BSA zeigte sich nach 18 h Messzeit eine um rund 22 % höhere Fluoreszenzintensität im Vergleich zur nicht reduzierten Probe. Dabei wurden nach zwei Stunden rund 58 % des Maximalwerts (18 h) erreicht. Im Gegensatz dazu zeigte der Kurvenverlauf der reduzierten Probe von **PII-ds** zunächst eine Verzögerung im Anstieg der Fluoreszenz im Vergleich zur Probe ohne TCEP. Nach rund 3.5 h kreuzten sich allerdings beide Kurvenverläufe und erreichten am Ende der 18 h Messzeit ein Plateau, bei dem die reduzierte Probe eine ca. 10 % höherer Fluoreszenzemission zeigte.

Die Untersuchungen mittels Fluoreszenzspektroskopie und dynamischer Lichtstreuung zeigten also, dass **PI-ds** größere Aggregate mit *m*-THPC bildet, welche eine verbesserte trans-Solubilisierung zu BSA durch die Spaltung der Peptidsequenz des Konjugats erreichte. **PII-ds** hingegen formte kleinere Aggregate und zeigte eine anfängliche Hemmung der Freisetzung des Wirkstoffs durch die Reduktion der Disulfid-Brücke. Da die chemischen Eigenschaften der beiden Peptidsequenzen bezüglich Aromatizität und Polarität sehr ähnlich waren, schien der polare Glutamin-Rest im *N*-terminalen Tetramer-Segment von **PI-ds** eine zentrale Rolle zu spielen. Dieser war wahrscheinlich sowohl für den Beladungsgrad als auch für die Freisetzung des Gastmolekül mit und ohne die Spaltung des Peptidsegments von Bedeutung. Die Spaltung des Konjugats **PI-ds** in seine zwei Fragmente führte zu einem Phenylalanin Trimer gebunden am PEO-Block und einem im Vergleich zu **PII-ds** weniger hydrophoben Tetramer Leu-Trp-Gln-Tyr. Da letzteres nach der Spaltung wahrscheinlich weniger stark zur Stabilisierung des Komplexes mit *m*-THPC beitrug oder den Komplex wahrscheinlich sogar verlassen könnte, war eine Beschleunigung der Freisetzung von *m*-THPC durch die Spaltung des Konjugats durchaus naheliegend. Für das Konjugat **PII-ds** hingegen bedeutete die Reduktion des Disulfid-Linkers die Abspaltung des *N*-Terminalen Tetramers Leu-Phe-Leu-Tyr und eines Trp-Phe-Leu-PEO-Blocks. In diesem Fall waren beide Peptidsegmente äußerst hydrophob und formten laut Bindungsstudie eine sehr dichte Packung mit *m*-THPC. Nach der Spaltung würden somit beide Fragmente voraussichtlich weiterhin stark an dem Wirkstoff haften und den Komplex stabilisieren, was den Wirkstoff am Verlassen des hydrophoben Kerns des Aggregats hindern könnte. Die Hemmung der Aktivierung nach Reduktion von **PII-ds** mit TCEP ließ sich dadurch erklären, dass durch die Spaltung des Cystamin-Linkers

weitere Freiheitsgrade für die räumlich noch nähere Anordnung der Peptidfragmente an den Wirkstoff gewonnen wurden. Diese Vermutung würde auch die in der dynamischen Lichtstreuung beobachtete Verringerung des hydrodynamischen Radius der Aggregate von **PII-ds** mit *m*-THPC durch die Zugabe von TCEP erklären.

Bisher konnten somit in drei verschiedenen *Screenings* Sequenzen für die nichtkovalente Bindung von *m*-THPC identifiziert werden. Des Weiteren wurden aus der Vielzahl an erhaltenen Sequenzen einige erfolgreich auf ihre Eignung als Löslichkeitsvermittler für den Wirkstoff in Form von Peptid-PEO-Konjugaten getestet und Möglichkeiten für die Modifikation und Optimierung der Eigenschaften besonders im Hinblick auf Beladungskapazität und Feinjustierung der Freigabekinetik von *m*-THPC evaluiert. Darin, ebenso wie in computergestützten Bindungsstudien dieser Sequenzen mit *m*-THPC, wurde deutlich, dass hydrophobe und π - π -Wechselwirkungen die Haupttriebkraft für die Bindung des Photosensibilisators darstellen. In Anbetracht der starren, aromatischen Struktur von *m*-THPC waren diese Ergebnisse einleuchtend. Weiterer Klärungsbedarf stellte sich jedoch bezüglich der Frage, wie leistungsfähig die entwickelte Methode in Hinblick auf das Auslesen verschiedener struktureller Merkmale bei unterschiedlichen niedermolekularen Verbindungen war.

3.6. Vergleich verschiedener Photosensibilisatoren im *Screening*

Die Methoden zum *Screening* peptidischer Bindungspartner und der Solubilisierung niedermolekularer Wirkstoffe mit daraus resultierenden Peptid-PEO-Konjugaten wurden im Rahmen dieser Arbeit bisher ausschließlich für den Photosensibilisator *m*-THPC angewendet. Ziel des folgenden Abschnitts war es daher, die Abhängigkeit der aus der Sequenzierung hervorgehenden Motive von der Struktur des verwendeten Wirkstoffs zu untersuchen. Daher sollte überprüft werden, ob sich auch kleine Unterschiede in der getesteten Struktur mit der Methode des *Screenings* einer *Split&Mix*-Peptidbibliothek auslesen lassen. Um das Potential der Methode auszuloten, wurden zwei strukturell sehr ähnliche Verbindungen gewählt, Chlorin E6 (Ce6) und Pheophorbid A (Pba) (**Abbildung 41**). Bei den beiden Substanzen handelt es sich ebenfalls um Photosensibilisatoren der zweiten Generation, welche ein Chlorin-Grundgerüst besitzen. Im Gegensatz zu *m*-THPC verfügen Ce6 und Pba über Substituenten mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen. Dabei befinden sich auf der einen

Seite der planaren Ringstruktur aliphatisch hydrophobe Methyl-, Ethyl- und Vinyl-Gruppen, während die andere Seite eher über polare und geladene Substituenten verfügt. Pba trägt hier eine Carboxylgruppe, einen Methylester und ein Keton, während Ce6 mit drei Carboxylgruppen sogar drei Ladungen trägt und damit von allen drei PS am besten wasserlöslich ist.

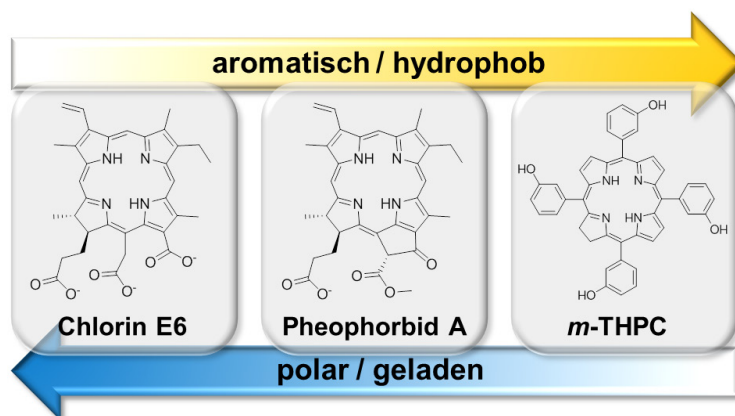


Abbildung 41. Vergleich der Strukturen der Photosensibilisatoren Chlorin E6, Pheophorbid A, und *m*-THPC und der daraus hervorgehenden Eigenschaften der Wirkstoffe.

Analog zu der für *m*-THPC entwickelten Methodik wurde die festphasengebundene *Split&Mix*-Peptidbibliothek **Bib1** jeweils mit Ce6 und Pba inkubiert. Auch hier war wieder eine Anreicherung des entsprechenden Wirkstoffs an einzelnen Harzpartikeln zu beobachten, was sich durch eine intensive Fluoreszenz der beiden PS äußerte (**Abbildung 42**). Für jeden der beiden Wirkstoffe wurden jeweils 40 positive Treffer mit Hilfe einer Mikropipette isoliert und die Peptide nach Abspaltung von Träger durch Reaktion mit CNBr mittels MALDI-Tof-MS/MS sequenziert (vgl. Kapitel 7.2, **Tabelle 21 + 22**).

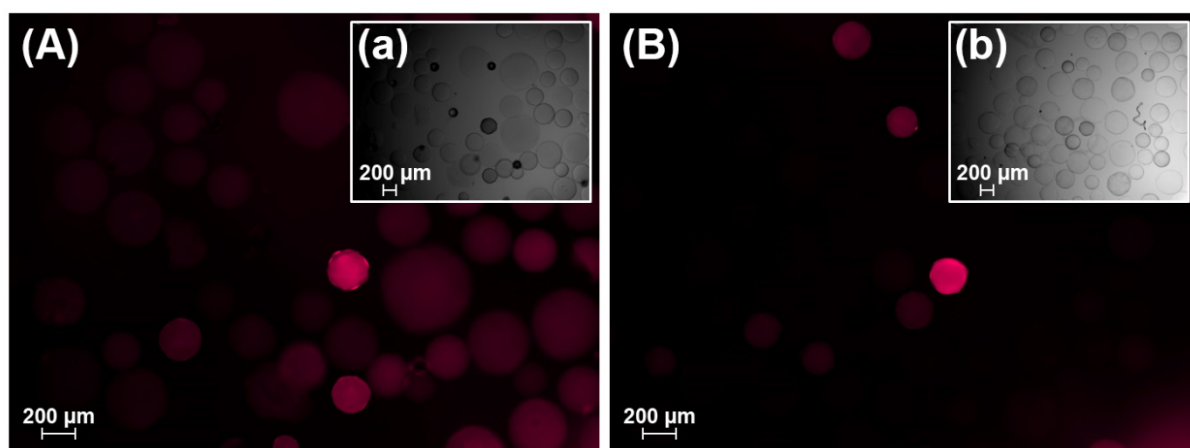


Abbildung 42. Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen des *Screenings* der **Bib1** gegen (A) Chlorin E6 und (B) Pheophorbid A, (a) / (b): Streulicht-Aufnahme des jeweiligen Bildausschnitts (Bedingungen: Partikelsuspension in Wasser, Anregung: 620 – 650 nm, Emission: 660 – 710 nm).

Die statistische Zusammensetzung der gefundenen Aminosäuresequenzen des *Screenings* von Ce6 und Pba gegen die **Bib1** verglichen mit den Ergebnissen für *m*-THPC sind in **Abbildung 43** gegenübergestellt. Generell wurde wieder Phenylalanin in besonders hoher Anzahl in den Sequenzen wiedergefunden, was die aromatische Grundstruktur der PS widerspiegelt. *m*-THCP besitzt allerdings als einziger der Kandidaten vier äußere Hydroxyphenyl-Substituenten. Die damit deutlich aromatischere Struktur ließ sich auch in den selektierten Aminosäuren wiederfinden. Beim *Screening* von *m*-THCP wurden von den drei PS am häufigsten Phenylalanin-Reste selektiert, welche für π - π -Wechselwirkungen zwischen PS und Peptid nötig sind. Dafür wurde für Ce6 und Pba im Vergleich zu *m*-THPC deutlich häufiger Serin als polar ungeladene Aminosäure gefunden, welche Wasserstoffbrücken mit den beiden etwas polarerer und geladenen PS eingehen kann. Da Ce6 und Pba etwas kleiner als *m*-THPC sind, könnte es auch möglich sein, dass weniger Aminosäureseitenketten tatsächlich direkte Bindungen mit den PS eingehen, sondern möglicherweise mit dem umgebenden Wasser wechselwirken. Dennoch fielen die Unterschiede in der Gesamtzusammensetzung der Aminosäuren gering aus, was sich mit den sehr ähnlichen Strukturen der PS erklären ließ. Inwiefern die gefundenen Aminosäuresequenzen spezifisch für den jeweiligen PS sind, sollte somit durch den Vergleich der Eigenschaften der daraus resultierenden Konjugate untersucht werden.

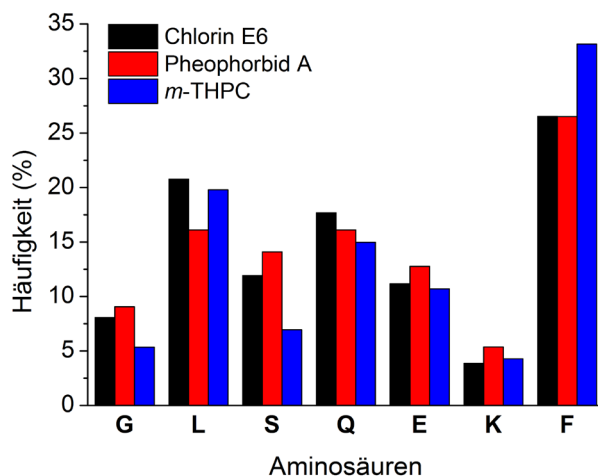


Abbildung 43. Relative Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren in den gefundenen Sequenzen aus dem *Screening* von Chlorin E6 (schwarz), Pheophorbide A (rot) und *m*-THPC (blau) gegen die Peptidbibliothek (**Bib1**).

Von den gefundenen Aminosäuresequenzen des *Screenings* von Ce6 und Pba wurden jeweils zwei als Peptid-PEO-Konjugate synthetisiert (**Abbildung 44**). Beim Screening von Ce6 wurden im Vergleich zu den anderen Sensibilisatoren vermehrt Glutamin- und Leucin-Reste in den Aminosäuresequenzen gefunden. Daher wurde für Ce6 eine Sequenz (**PI_{Ce6}** / H₂N-QFQQSFF-PEO) mit vier polaren und bei neutralem pH-Wert ungeladenen Aminosäuren (Gln und Ser) ausgewählt. Dennoch waren in der Sequenz weiterhin drei aromatische Phenylalanine vorhanden, welche potentiell π - π -Wechselwirkungen mit dem Sensibilisator eingehen können. Die zweite besaß mit vier Leucin-Resten (**PII_{Ce6}** / H₂N-QLLLQLF-PEO) viele aliphatisch hydrophobe Seitenkettenfunktionalitäten, wohingegen nur ein Phenylalanin und zwei Glutamin-Reste enthalten waren. Da sich bisher jeweils Phenylalanin und Leucin als besonders effektiv für die Bindung der Photosensibilisatoren erwiesen haben, stellen somit beide Sequenzen potentiell gute Binder für Ce6 dar. Bei Pba hingegen bestand die erste Sequenz aus einer Kombination aus Phenylalanin, Leucin und Glutamin (**PI_{Pba}** / H₂N-FQLFQLQ-PEO), welche der Sequenz von **PII** für die Solubilisierung von *m*-THPC ähnelte. Allerdings besaß **PI_{Pba}** keinen zentralen hydrophoben Block aus Phe- und Leu-Resten, wie bei **PII**. Die aromatischen und hydrophoben Reste waren gleichmäßig von polarem Glutamin durchsetzt, welches sich bei **PII** nur an den jeweiligen Termini befand. Die zweite Sequenz bestand aus einem polar geladenen Teil mit zwei Lysin- und einem Glutaminsäure-

Rest (**PII_{Pba}** / H₂N-FLFKEKS-PEO), während *N*-terminal ein hydrophobes Trimer zu finden war. Diese Sequenz wurde gewählt, da sich bei der Auswertung der Screening-Ergebnisse (vgl. Kapitel 7.2) einige Peptide fanden, bei denen ein oder mehrere Lysin-Reste nahe des C-Terminus lokalisiert waren. Des Weiteren flankierten bei **PII_{Pba}** die Lysin-Reste einen aromatisch hydrophoben Block, so dass bezogen auf die Struktur von *Pba* gleichzeitig π - π -Wechselwirkungen des aromatischen Grundgerüsts des Sensibilisators mit Phe-Resten, sowie Wasserstoffbrückenbindung zwischen dessen Carboxyl-Funktion und den Aminogruppen der Lys-Reste denkbar waren.

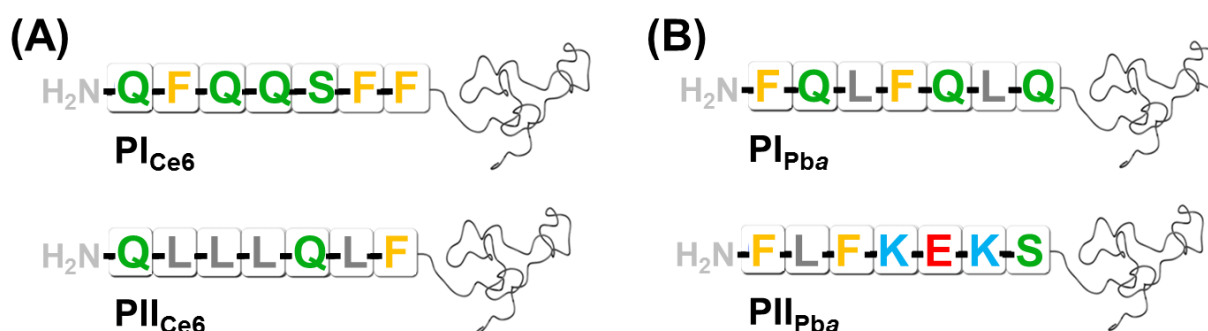


Abbildung 44. Die Aminosäuresequenzen der Peptid-PEO-Konjugate, welche als potentielle Solubilisatoren für (A) Ce6 (**PI_{Ce6}** und **PII_{Ce6}**) und (B) *Pba* (**PI_{Pba}** und **PII_{Pba}**) dienen sollten.

Für das Verständnis der nichtkovalente Bindung der Peptidsegmente von **PI_{Ce6}**, **PII_{Ce6}**, **PI_{Pba}** und **PII_{Pba}** zu Chlorin E6 bzw. Pheophorbid A auf molekularer Ebene wurden wiederum Bindungsstudien durchgeführt.⁹ Es wurden jeweils idealisierte 1 : 1 Komplexe aus Peptid und Photosensibilisator mit der Software *MOLOC* unter Vernachlässigung des PEO-Blocks modelliert.^[227] **Abbildung 45** zeigt die bevorzugten Dispositionen der jeweiligen Peptide um Ce6 und *Pba*. Im Allgemeinen war dabei zu erkennen, dass viele der hydrophoben Aminosäure-Reste in keine direkten, intermolekularen Wechselwirkungen mit den Wirkstoffen verwickelt waren. Vielmehr befanden sie sich in intramolekularen Wechselwirkungen innerhalb der Peptide, wodurch sie indirekt zur Stabilisierung der Komplexe beitrugen.

⁹ *In silico* Bindungsstudien der Peptidsegmente der Konjugate **PI_{Ce6}**, **PII_{Ce6}**, **PI_{Pba}** und **PII_{Pba}** mit einer C-terminalen EO-Einheit wurden von Tiziana Masini und Prof. Dr. Anna K. H. Hirsch der Rijksuniversiteit Groningen (NL) durchgeführt.

Die Wechselwirkungen von **PI_{Ce6}** mit Ce6 waren bestimmt durch die Ausbildung eines komplexen Netzwerkes an Wasserstoffbrückenbindungen, welche über die Amid-Funktionen der Seitenketten zweier Glutamin-Reste (Gln₁ und Gln₄) des Peptids vermittelt wurden (**Abbildung 45A**). Ein ähnliches Motiv fand sich auch zwischen **PII_{Ce6}** und Ce6 (**Abbildung 45B**) mit den Resten Gln₁ und Gln₅. Zusätzlich interagierten zwei der vier Leucin-Reste (Leu₃ und Leu₄) von **PII_{Ce6}** direkt mit Ce6, während die anderen in intramolekularen hydrophoben Wechselwirkungen (Leu₆) verwickelt oder dem umgebenden Lösemittel ausgesetzt waren (Leu₂).

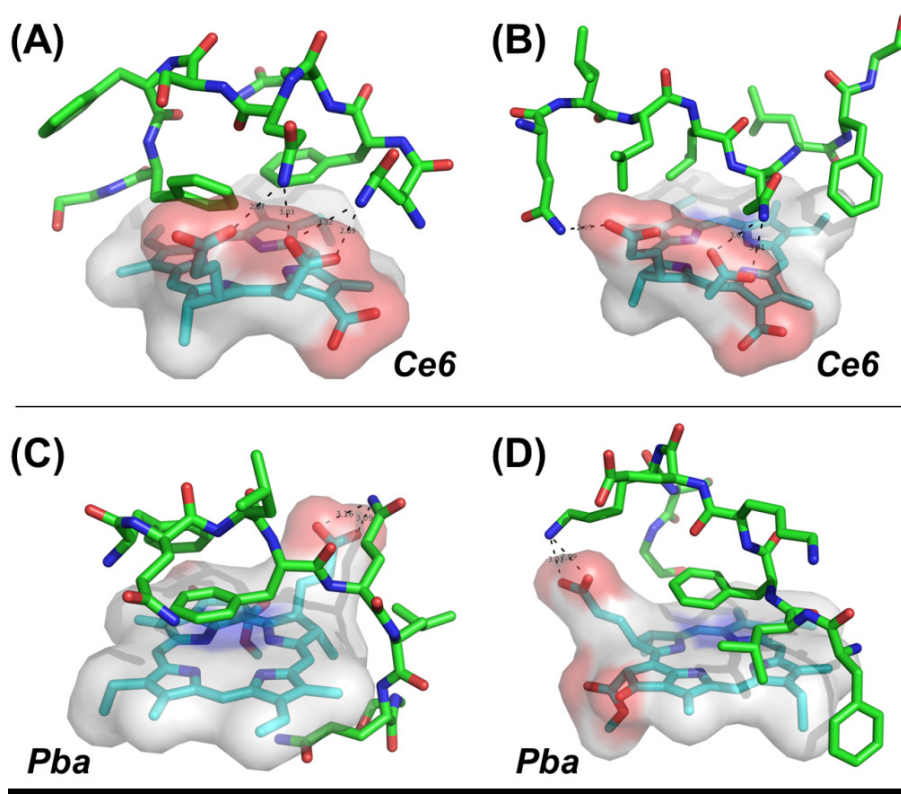


Abbildung 45: Bindungsstudien der Wechselwirkungen zwischen Chlorin E6 bzw. Pheophorbid A (als grüne Stäbe und *van-der-Waals*-Oberfläche dargestellt) und der Peptid-Segmente der Biokonjugate **PI_{Ce6}**, **PII_{Ce6}**, **PI_{Pba}**, **PII_{Pba}** (als blaue Stäbe dargestellt) als idealisierte 1:1-Komplexe: (A) **PI_{Ce6}**/Ce6, (B) **PII_{Ce6}**/Ce6, (C) **PI_{Pba}**/Pba, und (D) **PII_{Pba}**/Pba. Die Abbildungen wurden in *PYMOL* erstellt.

Das berechnete Modell von **PI_{Pba}** und Pba deutete darauf hin, dass ein zangenartiges Umschließen des Photosensibilisators durch das Peptid möglich war. Hierbei bildete Pba π - π -Wechselwirkungen mit den aromatischen Seitenketten der Phenylalanine (Phe₁ und Phe₄)

und der Amid-Gruppe des C-terminalen Glutamin-Restes (Gln₇) aus (**Abbildung 45C**). Zusätzlich verankerten zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carboxyl-Funktion von Pba und Gln₅ den Wirkstoff mit dem Peptid, wodurch der zangenartige Komplex bevorzugt wurde. Für den Komplex von **PII_{Pba}** und Pba konnte hingegen keine zangenartige Struktur wie bei **PI_{Pba}** gefunden werden (**Abbildung 45D**). Nichtsdestotrotz schien der berechnete Komplex stabil zu sein und umfasste zahlreiche hydrophobe Wechselwirkungen. Auch hier war das Peptid über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carboxyl-Funktion von Pba und der Seitenketten-Aminofunktion eines Lysin-Restes (Lys₆) mit dem Wirkstoff verankert.

Während für **PI_{Ce6}** / Ce6 und **PII_{Pba}** / Pba ein Komplex mit einer 1 : 1 Stöchiometrie von Wirkstoff zu Konjugat den Bindungsstudien nach möglich war, so schien dies im Fall von **PII_{Ce6}** / Ce6 und **PI_{Pba}** / Pba aufgrund von hydrophoben, aber gleichzeitig dem umgebenden Lösemittel zugewandten Aminosäure-Resten eher unwahrscheinlich zu sein. Hier ist eine Aggregatbildung mit weiteren Konjugat- oder Wirkstoffmolekülen wohlmöglich von Vorteil.

Ce6 und Pba wurden anschließend nach der bekannten Gefriertrocknungs- und Resuspensionsprozedur mit den Konjugaten solubilisiert (**Tabelle 10**). Bei absorptionsspektroskopischer Bestimmung der Konzentration in Lösung zeigte sich, dass **PI_{Ce6}** 0.56 mmol Ce6 pro mmol Konjugat (Verhältnis 1 : 1.8 von Ce6 zu **PI_{Ce6}**) in Lösung bringen konnte, während für **PII_{Ce6}** nur eine sehr geringe Konzentration von 0.02 mmol Ce6 pro mmol Konjugat (Verhältnis 1 : 50 von Ce6 zu **PII_{Ce6}**) des PS in Lösung festgestellt werden konnte. Für die Bindung von Ce6 waren offenbar aromatische und polar-ungeladene Seitenkettenfunktionalitäten wichtiger als aliphatisch-hydrophobe wie Leucin, welche bei **PII_{Ce6}** vornehmlich zu finden waren. Im Fall von Pba konnte **PI_{Pba}** 0.45 mmol pro mmol Konjugat (Verhältnis 1 : 2.2 von Pba zu **PI_{Pba}**) und **PII_{Pba}** 0.41 mmol pro mmol Konjugat (Verhältnis 1 : 2.4 von Pba zu **PII_{Pba}**) des PS solubilisieren. Die bekannte Kombination aus Phe, Leu und Gln zeigte sich hier wieder effektiver. Dennoch war es bemerkenswert, dass im Fall von **PII_{Pba}** eine Sequenz, welche nur ein relativ kleines aromatisch-hydrophobes Trimer besaß, während das C-terminale Tetramer drei Ladungen trug, den PS noch relativ gut gelöst hatte. Das galt besonders für Lysin, welches sich bei der Solubilisierung von *m*-THPC als ungeeignet erwiesen hatte. Möglicherweise kam es hier zu ionischen Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Carboxylfunktionen von Pba und den positiv geladenen

Lysin-Resten, welche beim ungeladenen *m*-THPC in der Form nicht stattfinden konnte. Insgesamt konnten aber sehr gute Beladungsgrade bei der Solubilisierung der beiden PS für jeweils eines der selektierten Konjugate erreicht werden.

Tabelle 10: Beladungsgrade der Konjugate **PI_{Ce6}** und **PII_{Ce6}** mit Chlorin E6 und **PI_{Pba}** und **PII_{Pba}** mit Pheophorbid A, sowie Kontrollexperimente zur Spezifität der Wechselwirkung durch Beladung mit *m*-THPC.

	Konzentration <i>m</i> -THPC [mmol/mmol Konjugat]	Wirkstoff/ Transporter Verhältnis
PI_{Ce6} + Ce6	0.56	1 : 1.8
PII_{Ce6} + Ce6	0.02	1 : 50
PI_{Ce6} + <i>m</i>-THPC	0.03	1 : 33
PI_{Pba} + Pba	0.45	1 : 2.2
PII_{Pba} + Pba	0.41	1 : 2.4
PI_{Pba} + <i>m</i>-THPC	0.07	1 : 14

Um die Selektivität der Konjugate gegenüber dem jeweiligen gescreenten Sensibilisator zu testen, wurde zusätzlich *m*-THPC mit den Konjugaten **PI_{Ce6}** und **PI_{Pba}** solubilisiert (**Tabelle 10**). Während für *m*-THPC ein Wert von 0.31 mmol pro mmol Konjugat (Verhältnis 1 : 3.3) mit **PII** erreicht wurde, welches im *Screening* von *m*-THPC identifiziert wurde, zeigten sich deutlich schlechtere Beladungsgrade für die Konjugate, welche aus den Screenings von Ce6 und Pba stammten. Es wurden lediglich 0.03 mmol *m*-THPC pro mmol **PI_{Ce6}** (Verhältnis 1 : 33) und 0.07 mmol *m*-THPC pro mmol **PI_{Pba}** (Verhältnis 1 : 14) solubilisiert. In Anbetracht des deutlich höheren Beladungsgrades bei der Solubilisierung der eigentlichen Zielmoleküle (0.26 mmol Ce6 / mmol **PI_{Ce6}** und 0.45 mmol Pba / mmol **PI_{Pba}**) im Vergleich zur Solubilisierung von *m*-THPC konnte von einer deutlichen Selektivität und höheren Effektivität gegenüber des Sensibilisators gesprochen werden, für den das jeweilige Konjugat entwickelt wurde. Somit schien es trotz der sehr ähnlichen Strukturen der drei getesteten Photosensibilisatoren möglich zu sein, für die jeweilig getestete Struktur spezifisch bindende Konjugate mit Hilfe des entwickelten *Screening*-Verfahrens zu identifizieren.

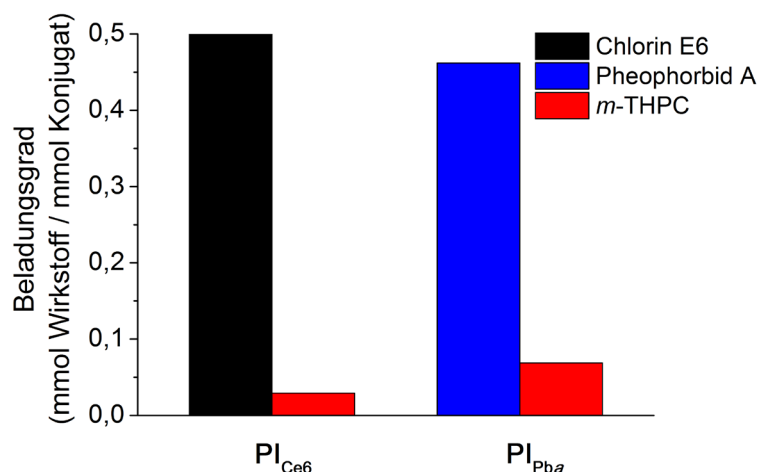


Abbildung 46: Vergleich der Beladungsgrade von **PI_{Ce6}** und **PI_{Pba}** mit dem Wirkstoff (Chlorin E6 bzw. Pheophorbid A), aus dessen *Screening* deren jeweilige Peptidsequenz hervorging, und mit *m*-THPC als Referenzexperiment, um Rückschlüsse auf ihrer Spezifität gegenüber des Bindungspartners treffen zu können.

Der erste getestete PS *m*-THPC wurde in einer inaktivierten Form in Aggregaten mit den Konjugaten solubilisiert. Dieser Zustand ließ sich aber durch die Zugabe von BSA aufheben, da durch Übertragung von PS-Molekülen eine fortschreitende Monomerisierung des PS stattfand und somit die Fluoreszenz und die Erzeugung von $^1\text{O}_2$ zunahmen. Es ist aber bekannt, dass Ce6 und Pba eine deutlich geringere Affinität gegenüber Serum Albumine besitzen. Vorversuche zur Fluoreszenzemission hatten gezeigt, dass mit Peptid-PEO-Konjugaten solubilisiertes Ce6 und Pba nicht nennenswert fluoresziert (vgl. Kapitel 6.10, **Abbildung 59**). Im Gegensatz zu *m*-THPC ließ die Zugabe von BSA diese aber auch nicht nennenswert ansteigen. Damit verhielten sich Ce6 und Pba in den Fluoreszenzkinetiken gegensätzlich zu *m*-THPC. Das tatsächliche Verhalten der beiden neuen PS bezüglich trans-Solubilisierung auf Proteine oder Monomerisierung ließ sich somit nicht aus Daten der Fluoreszenzemission ableiten. Ein Indiz dafür, dass aber dennoch eine Wechselwirkung oder wohlmöglich sogar die trans-Solubilisierung der PS auf BSA-Moleküle stattfand, konnte mittels DLS gefunden werden (**Tabelle 11 + 12**). Es zeigte sich zunächst das bekannte Bild. Ohne die PS bildeten die Konjugate **PI_{Ce6}** und **PI_{Pba}** keine größeren Aggregate in wässriger Lösung. Nach der Beladung mit den Wirkstoffen konnten wieder Aggregate mit einem hydrodynamischen Radius von rund 63 nm im Fall von **PI_{Ce6}** und Ce6, sowie 43 nm bei **PI_{Pba}** mit Pba, gemessen werden. Somit verhielten sie sich analog zu *m*-THPC mit **PII**, auch wenn

die Aggregate im Vergleich kleiner ausfielen. Bei identischen Proben, welche über Nacht mit BSA inkubiert wurden, waren deutlich geringere hydrodynamische Radien zu beobachten. Somit wurde wahrscheinlich über das Herauslösen von Gastmolekülen aus den Konjugat / PS-Aggregaten durch das Protein ein Auflösen der Konjugat-Aggregate mit der Zeit erreicht. Weiterführende Experimente wären hier jedoch wünschenswert.

Tabelle 11. Messungen der hydrodynamischen Radien des Konjugats **PI_{Ce6}**, jeweils unbeladen, beladen mit Chlorin E6 und nach der Inkubation mit BSA mittels dynamischer Lichtstreuung.

	PI_{Ce6}	PI_{Ce6} + Ce6	PI_{Ce6} + Ce6 + BSA
Ce6	7 ± 4 nm	63 ± 2 nm	8 ± 1 nm

Tabelle 12. Messungen der hydrodynamischen Radien der Konjugate **PI_{Pba}**, jeweils unbeladen, beladen mit Pheophorbid A und nach der Inkubation mit BSA mittels dynamischer Lichtstreuung.

	PI_{Pba}	PI_{Pba} + Pba	PI_{Pba} + Pba + BSA
Pba	11 ± 9 nm	43 ± 1 nm	13 ± 1 nm

Insgesamt konnte also erfolgreich gezeigt werden, dass das *Screening*-Verfahren auch auf andere niedermolekulare Wirkstoffe anwendbar ist und sich selbst sehr geringe Unterschiede in der getesteten Struktur direkt in den Ergebnissen der Treffer-Sequenzierung wiederfinden lassen. So ging zum Beispiel im *Screening* von Ce6, welches im Vergleich zu *m*-THPC keine aromatischen Substituenten, dafür aber aliphatische Gruppen und Carboxyl-Funktionen trägt, der Anteil an aromatischen Aminosäuren (Phe) zurück, während aliphatische (Leu) und polare (Gln) etwas häufiger selektiert wurden. Wie schon im Fall von *m*-THPC schienen dennoch Phenylalanin, Leucin und Glutamin besonders wichtig für die nichtkovalente Bindung der Wirkstoffe zu sein (siehe **PI_{Ce6}** und **PI_{Pba}**), allerdings in einer weniger Block-artigen Anordnung der hydrophoben und aromatischen Aminosäuren. Ein zu hoher Anteil an Leucin- (**PII_{Ce6}**) oder Lysin-Resten (**PII_{Pba}**) schien wiederum weniger zielführend für die Solubilisierung der Sensibilisatoren zu sein. Bei der Modellierung der nichtkovalenten Bindung zwischen den Peptid-Segmenten der Konjugate und der jeweiligen Wirkstoffe zeigte sich besonders im Fall von Ce6 ein komplexes Netzwerk an Wasserstoffbrücken zwischen

dessen Carboxyl-Funktionen und Donoren wie Glutamin-Resten und dem *N*-Terminus der Peptids. Die Selektivität der jeweiligen Aminosäure-Sequenzen gegenüber den Wirkstoffen, aus deren Screening sie hervorgegangen waren, zeigte sich bei dem Versuch, *m*-THPC mit den Konjugate **PI_{Ce6}** und **PI_{Pba}** zu solubilisieren. Während beide Konjugate für Ce6 bzw. Pba gute Beladungsgrade aufwiesen, waren sie nicht in der Lage, größere Menge *m*-THPC in wässrige Lösung zu bringen und blieben deutlich unter der Beladung des Konjugats **PII**, welches für *m*-THPC entwickelt wurde. Somit konnten trotz sehr ähnlicher Strukturen der drei getesteten Photosensibilisatoren jeweils Aminosäuresequenzen selektiert werden, welche besonders gut für ihren entsprechenden Wirkstoff geeignet zu sein schienen. Diese Beobachtung sprach für das Potential der Methode, spezifische Bindungspartner für die getesteten Wirkstoffe aus der Peptidbibliothek zu selektieren.

3.7. Aufnahme und Freisetzung der Wirkstoffe in Krebszellen¹⁰

Das entwickelte *Screening*-Verfahren lieferte bisher für verschiedene Photosensibilisatoren unter verschiedenen Bedingungen diverse Aminosäuresequenzen, welche konjugiert an einen wasserlöslichen PEO-Block ihre Eignung als spezifische Löslichkeitsvermittler bewiesen hatten. Ebenso konnte für *m*-THPC auch die effektive trans-Solubilisierung der Wirkstofffracht auf ein geeignetes Zielmolekül verfolgt und über Modifikationen der Peptidsequenzen oder der Konjugat-Architektur direkt beeinflusst werden. Um allerdings krankhaft verändertes Gewebe durch das Auslösen von Apoptose und Nekrose mittels PDT zu zerstören, ist die effektive Aufnahme der Wirkstoffe in Krebszellen eine der Schlüsselfragen. Der Weg der Zellaufnahme und die intrazelluläre Verteilung für verschiedene PS hängt von diversen physikochemischen Eigenschaften, wie Hydrophobizität, Art, Position und Anzahl an geladenen Gruppen, Anzahl der aromatischen Ringe und der Anwesenheit eines Zentralatoms innerhalb der Tetrapyrrol-Struktur ab.^[253] Außerdem spielt der Aggregationszustand eine große Rolle. *In vivo* ist die Situation zusätzlich verkompliziert, da viele PS nach der Injektion in die Blutbahn stark mit den Blutproteinen interagieren. Daher kann die Aufnahme der PS in einen bestimmten Zelltyp weniger von dessen eigentlichen Eigenschaften abhängen, sondern eher von den Eigenschaften der Blutbestandteile, welche

¹⁰ Die Untersuchungen zur *in vitro* Zellaufnahme wurden in Kooperation mit Dr. Annegret Preuss, Dr. Steffen Hackbarth und Prof. Dr. Beate Röder vom Institut für Physik der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt.

ihn tragen. Dieser Unterschiede in der Aufnahme durch Diffusion und Endozytose, sowie Wechselwirkung mit Blutbestandteilen oder künstlichen Wirkstofftransportern führt damit auch zu einem unterschiedlichen interzellulären Verteilungsmuster der PS.^[254] Generell können allerdings die Mechanismen der Zellaufnahme und damit auch die intrazelluläre Lokalisation eines PS sehr stark durch die Verwendung von verschiedenen *Drug Delivery*-Systemen und -Strategien beeinflusst werden.^[255] Für die PDT ist eine Lokalisation der PS in Lysosomen, Mitochondrien, der Plasmamembran, dem Golgi-Apparat und dem Endoplasmatischen Retikulum günstig. *m*-THPC ist dabei einer der wenigen PS, die sich vornehmlich dort anreichern.^[1,256] Die Effektivität der Aufnahme der mit den Peptid-PEO-Konjugaten solubilisierten PS, die interzelluläre Verteilung, sowie der Mechanismus der Zellaufnahme sollen in den folgenden Kapiteln näher untersucht werden.

3.7.1. Verfolgung der zellulären Aufnahme der Photosensibilisatoren *in vitro*

Inwiefern die Photosensibilisatoren, welche in Aggregaten mit den jeweiligen Peptid-PEO-Konjugaten gespeichert werden, in das Innere von Krebszellen gelangen, wurde zunächst mit Hilfe konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (engl.: *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM) untersucht. Dafür wurden *Jurkat*-Zellen mit den PS / Konjugat-Komplexen inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Fluoreszenz der Wirkstoffe innerhalb der Zellen aufgezeichnet. *Jurkat*-Zellen sind eine T-Lymphozyten Suspensions-Zelllinie, welche in den 1970er Jahren von einem 14jährigen, an T-Zellen Leukämie erkranktem Patienten gewonnen und kultiviert wurden.^[257] Sie sind eine gängige Zelllinie, um die Mechanismen der Aufnahme von Medikamenten in Krebszellen zu untersuchen.

Die drei Photosensibilisatoren *m*-THPC, Ce6 und Pba wurden jeweils mit dem für ihre Solubilisierung besonders effektiven Konjugat (**PII**, **PI_{Ce6}** und **PI_{Pba}**) gelöst, direkt in das Kulturmedium der Zellen gegeben (3 µmol/L Endkonzentration an PS) und die Zellen anschließend bei 37 °C inkubiert. Jeweils nach einer Inkubationszeit von 1 h, 3 h, 5 h und 24 h wurden mehrere Streulicht- und Fluoreszenz-Aufnahmen mit CLSM von den Zellen aufgezeichnet (**Abbildung 47**). Vor jeder Mikroskopie-Aufnahme wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen, um ausschließlich Fluoreszenzsignale von Photosensibilisator-Molekülen zu erhalten, welche sich tatsächlich innerhalb der Zellmembran befanden.

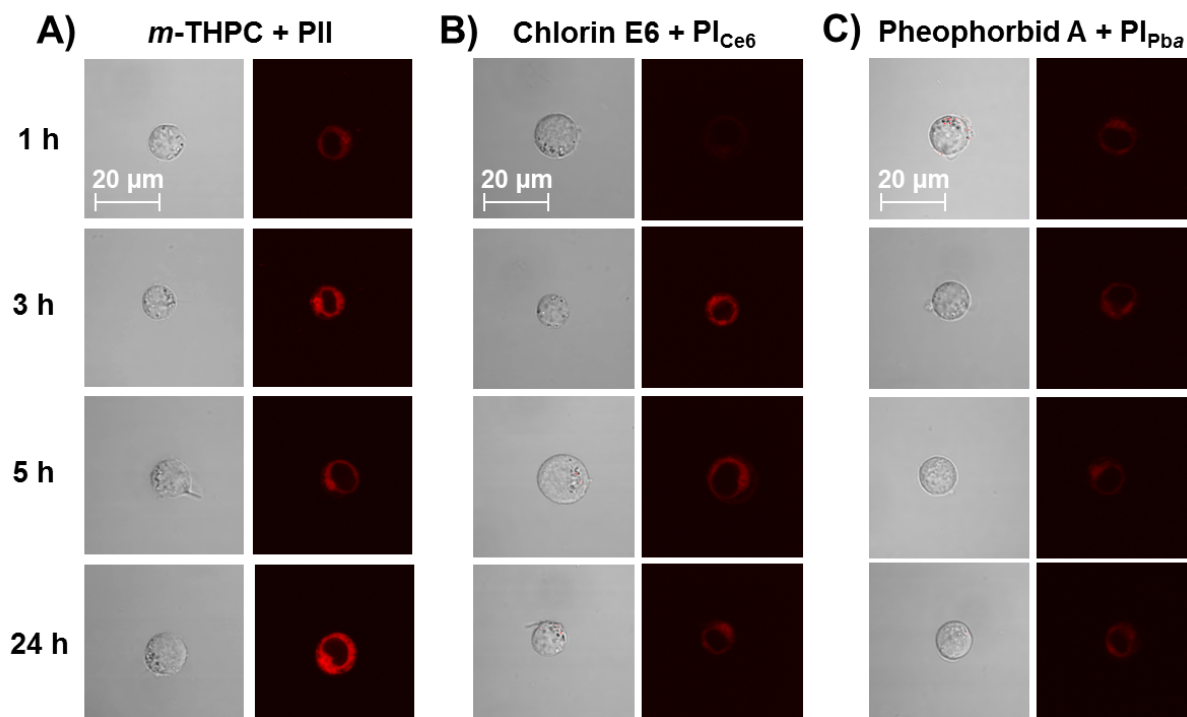


Abbildung 47. Aufnahmen von *Jurkat*-Zellen nach 1 h, 3 h, 5 h und 24 h Inkubation mit (A) *m*-THPC / **PII**, (B) Chlorin E6 / **PI_{Ce6}** und (C) Pheophorbid A / **PI_{Pba}** mittels Konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie, im Streulicht- (links) und Fluoreszenzmodus (rechts); (Bedingungen: Anregung: 405 nm, Emission: 650 nm).

Für alle drei Wirkstoff/ Konjugat-Kombinationen war mit der Zeit ein Anstieg der Fluoreszenzintensität der PS innerhalb der Zellen zu beobachten, so dass von einer effektiven Aufnahme der Wirkstoffe in die Zellen ausgegangen werden kann. Die Art der Aufnahme war damit aber nicht zweifelsfrei zu beweisen. Denkbar wäre zum einen die direkte Aufnahme der PS / Konjugat-Komplexe mittels Endozytose, zum anderen, dass die Wirkstoffe auf Serumproteine im Medium trans-solubilisiert wurden und auf diesem Weg in die Zellen gelangen.

In Kontrollexperimenten mit den freien Wirkstoffen, welche in Ethanol gelöst in das Kulturmedium gegeben wurden, war allerdings ebenfalls Fluoreszenz der PS innerhalb der Zellen sichtbar (vgl. Kapitel 6.16, **Abbildung 63**). In diesem Fall könnten die PS über im Medium befindlichen Serum Proteine in die Zellen gelangen. Es ist aber auch möglich, dass Aggregate der PS, welche sich bei Kontakt mit dem wässrigen Medium bilden, direkt endozytiert wurden.

Im Vergleich dieser Ergebnisse mit bereits veröffentlichten Experimenten lassen sich allerdings Übereinstimmungen erkennen. So zeigten Compain *et al.*, dass freies *m*-THPC in der Standardformulierung ebenfalls *in vitro* effektiver in Zellen aufgenommen wurde, als es bei *m*-THPC in PEGylierten Liposomen (Fospeg[®]) der Fall war.^[258] Dies ließ sich in der Form aber nicht auf die Effektivität der Verteilung und Aufnahme *in vivo* übertragen. Buchholz *et al.* zeigten an Katzen mit Plattenepithelkarzinomen als Tiermodell, dass die Plasmakonzentration und Bioverfügbarkeit von *m*-THPC in Form von Fospeg[®] nach 4 h dreimal höher war, als die von freiem *m*-THPC. Ebenso wurde die maximale Akkumulation in Tumoren 5.5-fach schneller erreicht.^[259] Außerdem war die Aufnahme von Fospeg[®] *in vitro* in Zellkulturmedium ohne fetales Kälberserum (FBS) deutlich höher, während sie mit steigender Konzentration an FBS abnahm.^[258] Bei Zellkulturmedium ohne FBS kann nur von der Aufnahme mitsamt der Transporter ausgegangen werden, da *m*-THPC aufgrund seiner Hydrophobizität in den Aggregaten mit den Transportermolekülen gefangen ist. Das Muster der Lokalisation in dieser Studie war aber für alle Medien unabhängig vom FBS-Gehalt identisch (auch nach kurzen Inkubationszeiten), so dass sich *m*-THPC sofort im Endosomen/Lysosomen vom Transporter zu trennen schien, um in das Zytoplasma zu diffundieren. Trotzdem verliefen beide Wege höchstwahrscheinlich über endozytotische Prozesse, da die Abkühlung auf 4 °C die Aufnahme um 95 % verminderte.^[258] Bei diesen Temperaturen sind die aktiven, energieabhängigen Stoffwechselprozesse wie Endozytose gehemmt. Ebenso reduzierte die Zugabe von Chlorpromazin, einem Inhibitor für Clathrin-vermittelte Endozytose, vor der Inkubation mit *m*-THPC bzw. Fospeg[®], die Aufnahme um 30 % bzw. 20 %.

Die Ähnlichkeiten im Verhalten der literaturbekannten Transporter-Systeme auf Basis von PEGylierten Liposomen mit denen der hier verwendeten Peptid-PEO-Konjugate sprach ebenfalls für eine endozytotische Aufnahme der PS mitsamt der Konjugate. Allerdings konnte mit der durchgeführten *in vitro*-Studie noch keine eindeutige Aussage getroffen werden, über welchen Aufnahmeweg die mit Peptid-PEO-Konjugate solubilisierten Photosensibilisatoren in die Krebszellen gelangten. Die Fragestellung sollte aber in den folgenden Kapiteln weiter beleuchtet werden. Dennoch konnte die erfolgreiche Aufnahme aller drei mit den jeweiligen für sie maßgeschneiderten Konjugat-Transportern solubilisierten Photosensibilisatoren in die Krebszellen gezeigt werden. Außerdem sprach die gleichmäßige, diffuse Verteilung der

Fluoreszenzsignale im Zytoplasma der Zellen für eine aktive, monomere Form der jeweiligen Solubilisatoren, in der sie durch Bestrahlung mit Licht zytotoxischen Singulett-Sauerstoff erzeugen können.

3.7.2. Fluoreszenzmarkierung von Peptid-PEO-Konjugaten

Besonders *m*-THPC ist bekannt dafür eine sehr hohe Bindungsaffinität zu Serum- und Lipoproteinen zu haben. Auch für *m*-THPC solubilisiert mit **PII** zeigte sich, dass durch die Zugabe von Zellkultur-Medium, welches ebenfalls FBS enthielt, der Photosensibilisator aus Aggregaten mit dem Konjugat gelöst und aktiviert werden konnte (vgl. Kapitel 6.10, **Abbildung 57**). Des Weiteren ist literaturbekannt, dass der Anteil an direkt als Wirkstoffaggregat aufgenommener PS mit steigender Konzentration an freiem *m*-THPC im Medium zunimmt, da die Serum-Fraktion nur eine bestimmte Menge an PS aufnehmen und in die Zellen schleusen kann.^[260] Außerdem verlangsamt die Anwesenheit von FBS im Medium die Aufnahme von freiem und liposomalem *m*-THPC (Fospeg[®]), da der Umweg über die Proteinfraction mehr Zeit benötigt, als die direkte Endozytose von aggregiertem bzw. liposomal gebundenem Wirkstoff, gefolgt von der Diffusion aus den Endo- und Lysosomen in das Zytoplasma.^[258,260]

Daher galt es herauszufinden, über welchen Aufnahmeweg der Wirkstoff solubilisiert mit Peptid-PEO-Konjugaten in die Zellen gelang. Zum einen war die Aufnahme der Aggregate durch Endozytose denkbar, sowie über den Umweg der Übertragung des PS auf Serum Proteine. Um diese Fragestellung näher beleuchten zu können, wurde das Konjugat **PII** für die Solubilisierung von *m*-THCP mit einer Rhodamin-Markierung versehen (**Rho-PII**, **Abbildung 48**), um die Konjugatmoleküle selbst in einem zweiten Fluoreszenz-Kanal neben dem Photosensibilisator verfolgen zu können. Gerade im Fall der Übertragung des Gastmoleküls von den Konjugat-Aggregaten auf Proteine als Transportweg in die Zellen sollte somit keine oder nur sehr geringe Fluoreszenz des Rhodamin-Labels innerhalb der Zellen zu beobachten sein.



Abbildung 48. Schematische Darstellung der Struktur des für die *in vitro* Zellversuche synthetisierten Peptid-PEO Konjugats **Rho-PII**, welches *N*-terminal mit zwei Glycin-Resten als Abstandhalter und einem Rhodamin-Label versehen wurde.

Bei der Beladung des fluoreszenzmarkierten Konjugates mit dem Wirkstoff zeigte sich, dass **Rho-PII** mit 0.76 mmol *m*-THPC pro mmol Konjugat (1 : 1.3 molares Verhältnis) eine deutlich höhere Beladung aufwies, als es bei **PII** der Fall war (0.31 mmol *m*-THPC / mmol Konjugat). Dieser Effekt lässt sich wahrscheinlich auf die aromatische Struktur der Rhodamin-Markierung zurückführen, welche zum einen selbst in der Lage sein wird, *m*-THPC über π - π -Wechselwirkungen zu binden und zu anderen durch den nun hydrophoben *N*-Terminus des Peptids die Tendenz der Konjugate zur Aggregation verstärkt. Ebenso zeigte sich ein Einfluss der Fluoreszenzmarkierung auf die Geschwindigkeit der trans-Solubilisierung zu BSA (vgl. Kapitel 6.10, **Abbildung 60**). Insgesamt stieg die Fluoreszenzemission nach Zugabe von BSA deutlich schneller an, als bei **PII** ohne Markierung. Dabei handelte es sich wohlmöglich in einen Konzentrationseffekt, da bedingt durch den höheren Beladungsgrad von **Rho-PII** die Anzahl an Wirkstoffmolekülen pro Konjugatmolekül zunahm, was deren Abschirmung durch die PEO-Hülle verschlechtern könnte. Zusätzlich wäre es möglich, dass mit Rhodamin wechselwirkende PS-Moleküle weniger stark und spezifisch gebunden waren, was ebenfalls die Freisetzung beschleunigen könnte. Ob diese Effekte auch einen Einfluss auf die Aufnahme in Krebszellen *in vitro* hat, sollte nun ebenfalls untersucht werden. Hauptaugenmerk lag dennoch auf der Aufnahme der Konjugate selbst in die Zellen, welche über die Rhodamin-Markierung lichtmikroskopisch verfolgt werden konnte.

Dafür wurden Kulturen von *Jurkat*-Zellen mit dem durch **Rho-PII** solubilisierten *m*-THPC inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 3 h, 5 h, 24 h) Aufnahmen der Zellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgezeichnet (**Abbildung 49**). Dies umfasste Aufnahmen in einem Fluoreszenzkanal spezifisch für Rhodamin, einem Kanal, welcher die

Fluoreszenz von *m*-THPC aufzeichnete, sowie reine Lichtmikroskopie-Aufnahmen (Streulicht) der Zellen. Es war eindeutig zu erkennen, dass sowohl das Rhodamin-markierte Konjugat, als auch *m*-THPC in die Zellen aufgenommen wurde. Der Rhodamin-Kanal zeigt dabei eine punktförmige Verteilung, was für die Einkapselung der Aggregate in Endo- bzw. Lysosomen sprach, während *m*-THPC sich deutlich homogener im Zytoplasma und den Zellorganellen verteilte. Damit war eine Aufnahme der intakten *m*-THPC / **Rho-PII**-Aggregate über den Mechanismus der Endozytose naheliegend, auf den die Diffusion des *m*-THPCs in das Zytoplasma folgte. Dass sich kein Photosensibilisator in den Zellkernen finden ließ, sprach außerdem dafür, dass die Zellen vital und intakt sind. Somit schienen die Konjugate keinen toxischen Effekt auf die Zellen zu haben. Eine sehr ähnliche punktuelle Verteilung im Inneren von Krebszellen wurde bereits für Rhodamin-markierte Liposomen beladen mit *m*-THPC gezeigt.^[258] Diese Verteilung war kolokalisiert mit einem Marker für Lysosomen (*Lysotracker Green*), was eindeutig auf eine endozytotische Aufnahme der Transporter in die Krebszellen, mit anschließender Lokalisation in Endosomen bzw. Lysosomen, schließen ließ. Dieser Aufnahmeweg war somit auch für *m*-THPC / Konjugat-Komplexe am naheliegendsten.

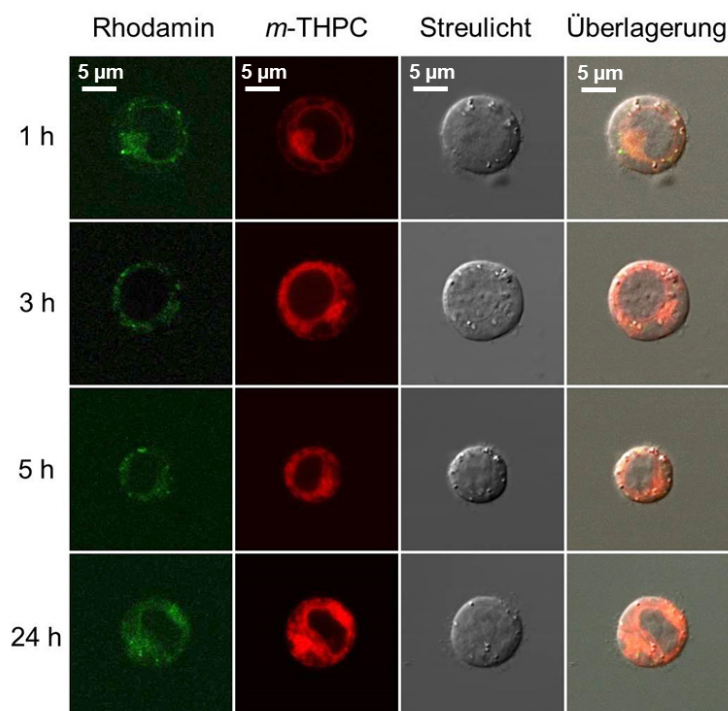


Abbildung 49. Aufnahmen von *Jurkat*-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation mit *m*-THPC / *Rho-PII* mittels Konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Gezeigt ist der Fluoreszenz-Kanal für Rhodamin (grün), für *m*-THPC (rot), sowie Aufnahmen der Zellen im Streulicht-Modus (grau) und die Überlagerung aller drei Aufnahmen (von links nach rechts, Bedingungen: Anregung: 405 nm, Emission: 520 nm (Rhodamin), 650 nm (*m*-THPC)).

Des Weiteren war in einem Kontrollexperiment, in welchem die Zellen nur mit dem Rhodamin-markierten Konjugat *Rho-PII* ohne *m*-THPC inkubiert wurden, ebenfalls die beschriebene Fluoreszenz innerhalb der Zellmembran sichtbar (vgl. Kapitel 6.16, **Abbildung 64**). Auch hier war eine punktuelle Verteilung der Konjugate zu beobachten. Somit gelangen Konjugatmoleküle auch im unbeladenen Zustand in die Zellen. Dabei war aufgrund des hohen Molekulargewichts des Konjugats das Eindringen in die Zellen über Diffusion durch die Membrandoppelschicht sehr unwahrscheinlich. Das sprach wiederum für die Aufnahme der Konjugat-Transporter mittels Endozytose.

Dennoch war die Fluoreszenz der Rhodamin-Markierung eher schwach im Vergleich zu *m*-THPC. Da das Emissionsspektrum von Rhodamin mit Teilen des Absorptionsspektrums von *m*-THPC überlappt, könnte beim beladenen Konjugat *Rho-PII* generell das Problem eines Förster-Resonanz Energietransfers (FRET) zwischen beiden Fluorophoren auftreten.

Die Emissionswellenlänge von Rhodamin als FRET-Donor überlagert sich mit einer Absorptionsbande von *m*-THPC. Bei dieser Wellenlänge lässt sich *m*-THPC als Akzeptor anregen, so dass bei räumlicher Nähe der beiden Fluorophore eine Energieübertragung stattfinden und die Fluoreszenz des Rhodamins vermindert bzw. ausgelöscht werden kann. Somit würde Rhodamin in der CLSM erst effektiv verfolgt werden können, sobald der PS in das Zytoplasma diffundiert ist, so dass Träger und PS voneinander räumlich getrennt vorliegen. Fluoreszenzspektroskopisch war die Auslöschung der Fluoreszenzemission der Rhodamin-Markierung durch Beladung von ***Rho-PII*** mit dem PS ebenfalls zu beobachten, was auch für ein Auftreten dieses Effektes bei den Mikroskopie-Aufnahmen mittels CLSM spricht.

3.7.3. Fluoreszenzlebenszeit-Mikroskopie von *m*-THPC in *Jurkat*-Zellen

Die Fluoreszenzlebenszeit-Mikroskopie (engl.: *Fluorescence Lifetime Imaging*, FLIM) ist eine spezielle Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie, bei der nicht die Intensität der Fluoreszenz, sondern die Lebensdauer des angeregten Zustands einer fluoreszierenden Spezies gemessen wird. Dafür werden die untersuchten Farbstoffe mit einem im Nanosekundenbereich gepulsten Laser angeregt und die mittlere Zeit gemessen, die das Molekül benötigt, um unter Emission von Fluoreszenz in seinen Grundzustand zu relaxieren.

Die Fluoreszenzlebensdauer ist dabei direkt von der Umgebung und der Wechselwirkung des Fluorophors mit anderen Molekülen abhängig. Mit dieser Methode besteht also die Möglichkeit, Veränderungen in der Umgebung der solubilisierten PS bei der Aufnahme in Zellen direkt zu verfolgen. Dabei verändert sich dessen Fluoreszenzlebensdauer durch die Wechselwirkung mit weiteren PS-Molekülen (*Quenching*), den Transportern, Zellmembranen, Proteinen und anderen Zytoplasma-Bestandteilen. Über die Fluoreszenzlebensdauer können also Rückschlüsse auf die tatsächliche Mikroumgebung der Fluorophore gezogen werden. Befinden sich wenige Moleküle in der Umgebung des PS, auf welche die Energie des angeregten Systems übertragen werden kann, so ist die Fluoreszenzlebensdauer entsprechend lang. Gerade im Falle von PS zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff ist die Zugänglichkeit des Wirkstoffs für molekularen Sauerstoff besonders ausschlaggebend, welcher einen Großteil der Anregungsenergie aufnimmt. Somit wird die Fluoreszenzlebenszeit in einer eher hydrophoben Umgebung wie in der Membrandoppelschicht oder insbesondere im hydrophoben Kern eines Aggregats aus

Wirkstoff und Peptid-Polymer-Konjugat deutlich länger sein, als bei monomolekular vorliegendem Sensibilisator z.B. nach der Diffusion in das Zytoplasma. Daher kann über die Messung der Fluoreszenzlebenszeit eine Aussage über die Aufnahme und Verteilung der Photosensibilisatoren innerhalb der Zelle getroffen werden.

Aus diesem Grund wurde parallel zu der Aufzeichnung der CLSM-Bilder (vgl. Kapitel 3.7.1) die Fluoreszenzlebenszeit von *m*-THPC innerhalb der *Jurkat*-Zellen gemessen (Abbildung 50). Die Zellen wurden jeweils 1 h, 3 h, 5 h und 24 h mit *m*-THPC inkubiert, welches zuvor mit **PII** oder *Rho*-**PII** solubilisiert wurde. Mit steigenden Inkubationszeiten sanken für beide Messreihen die Lebenszeiten stark ab, was ein eindeutiger Hinweis war, dass sich die Mikroumgebung und damit die Lokalisation der *m*-THPC-Moleküle innerhalb der Zelle veränderte (Tabelle 13).

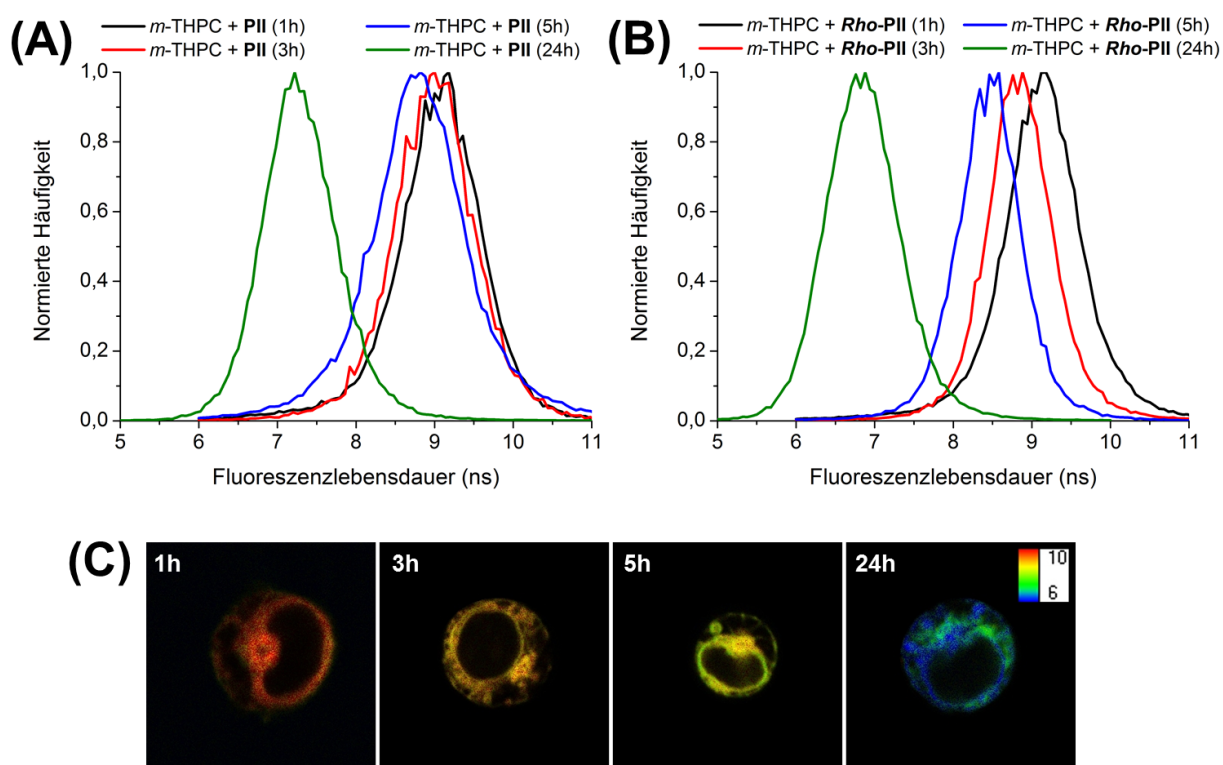


Abbildung 50. Histogramme der Fluoreszenzlebenszeit-Messungen von *m*-THPC in *Jurkat*-Zelle inkubiert mit (A) *m*-THPC / **PII** und (B) *m*-THPC / *Rho*-**PII** nach 1 h, 3 h, 5 h und 24 h. (C) Beispielbilder der Fluoreszenzlebenszeit in Zellen *m*-THPC / *Rho*-**PII** nach 1 h, 3 h, 5 h und 24 h (Farbskala: 6 nm (blau) bis 10 nm (rot)). Für alle Proben wurden mindestens vier Zellen vermessen und die Werte gemittelt (Bedingungen: Anregung (Puls): 440 nm, Emission: 650 nm).

Tabelle 13. Durchschnittliche Fluoreszenzlebenszeiten von *m*-THPC in *Jurkat*-Zellen zu verschiedenen Inkubationszeiten mit *m*-THPC / **PII** und *m*-THPC / **Rho-PII**. Es wurden mindestens vier Zellen pro Probe vermessen und die Werte gemittelt.

Inkubationszeit	1 h	3 h	5 h	24 h
<i>m</i> -THPC + PII	9.1 ns	9.0 ns	8.8 ns	7.2 ns
<i>m</i> -THPC + Rho-PII	9.1 ns	8.8 ns	8.5 ns	6.8 ns

Bei beiden Messreihen war eine Abnahme der Fluoreszenzlebenszeiten über die Inkubationszeit zu beobachten. Im direkten Vergleich der Messungen von **PII** und **Rho-PII** konnte keine Veränderung durch die Rhodamin-Markierung auf die Fluoreszenzlebenszeit von *m*-THPC und somit kein Einfluss auf die Freisetzung und Monomerisierung des Wirkstoffs aus den *m*-THPC / Konjugat-Aggregaten festgestellt werden. *m*-THPC solubilisiert mit **PII** zeigte nach 1 h Inkubation eine Fluoreszenzlebensdauer von rund 9.1 ns, welche sich über die Messzeit kontinuierlich verringerte und nach 24 h schließlich einen Wert von 7.2 ns erreichte. Für die Proben mit **Rho-PII** waren die Zeiten nur unwesentlich kürzer. Die erzielten Werte waren sehr ähnlich denen, welche von Preuß *et al.* für HSA-Nanopartikel als Transporter für die endozytotische Aufnahme von *m*-THPC gemessen wurden.^[103] Im Zusammenhang mit der mittels CLSM getroffenen Feststellung, dass die Fluoreszenz der Rhodamin-markierten Konjugate innerhalb der *Jurkat*-Zellen zu beobachten war, selbst bei der Inkubation mit unbeladenem **Rho-PII**, konnte also davon ausgegangen werden, dass die *m*-THPC / **Rho-PII**-Aggregate zunächst durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Anschließend löste sich der Wirkstoff vom Transporter und wurde in den Zellen verteilt, wobei er zunehmend monomolekular vorlag, so dass er aktiv und zugänglich für molekularen Sauerstoff war. Dies kann an der sinkenden Fluoreszenzlebensdauer erkannt werden. Denkbar wäre auch, dass die bindenden Peptidsegmente der Konjugate durch enzymatische Spaltung in den Lysosomen abgebaut wurden, was die Freisetzung der *m*-THPC-Moleküle zusätzlich beschleunigt hätte. Dennoch sind weitere Experimente zur Aufklärung des Aufnahmewegs der Wirkstoff / Konjugat-Aggregate wünschenswert.

4. Zusammenfassung

Die Wasserunlöslichkeit von niedermolekularen Wirkstoffen verursacht in der pharmazeutischen Medikamentenentwicklung immense Kosten. *Drug Delivery*-Systeme stellen eine elegante Methode dar, dieses Problem zu umgehen, ohne die Struktur der Wirkstoffe selbst verändern zu müssen. Den etablierten Systemen mangelt es allerdings an der präzisen Einstellbarkeit und Spezifität der Wechselwirkung mit ihren Gastmolekülen. Im Vergleich dazu bieten Biokonjugate diverse Vorteile. Besonders hervorzuheben ist die Präzision, mit der Wechselwirkungen zu einem Gastmolekül in monodisperse Biopolymere einer definierten Monomersequenz programmiert werden können. Um das volle Potential dieses Ansatzes ausnutzen zu können, galt es allerdings, möglichst gut geeignete Sequenzen aus einer großen Substanzbibliothek identifizieren zu können.

Somit wurde ein fluoreszenzbasiertes Auswahlverfahren (*Screening*) für die Selektion von Sequenzen aus einer festphasengebundenen Peptidbibliothek entwickelt, welche eine hohe Affinität für die nichtkovalente Bindung von niedermolekularen Wirkstoffen aufwiesen. Die mit dieser Methode identifizierten Aminosäuresequenzen konnten erfolgreich genutzt werden, um maßgeschneiderte Peptid-Polyethylenoxid-Konjugate zu synthetisieren, welche den Photosensibilisator *m*-THPC spezifisch binden und in wässrigen Medien in Lösung halten konnten. Der mit den Peptid-PEO-Konjugaten solubilisierter Photosensibilisator befand sich aufgrund von Aggregation mit den amphiphilen Peptid-PEO-Konjugaten im wässrigen Milieu in einem abgeschirmten, inaktivierten Zustand, welches mittels dynamischer Lichtstreuung, Fluoreszenzspektroskopie und Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz nachgewiesen werden konnte.

Zur Untersuchung der Freisetzung und trans-Solubilisierung des Wirkstoffs zu einem Zielmolekül konnte Serum Albumin als passendes Modellsystem identifiziert werden. Durch die Zugabe von Rinderalbumin (engl.: *bovine serum albumin*, BSA) zu den wässrigen Lösungen der Komplexe konnte eine Übertragung der PS auf das Protein ausgelöst werden. Dies hatte zur Folge, dass durch fortschreitende Monomerisierung des PS sowohl die Fluoreszenz als auch die Aktivität des Wirkstoffs bezüglich der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff mit der Zeit anstieg.

Durch die Verwendung verschiedener Lösemittel beim *Screening*, unterschiedlich großer PEO-Blöcke, verschiedener Peptid-Architekturen und spaltbarer Linker-Moleküle im Bindungsmotiv konnte gezielt Einfluss auf die Eigenschaften der Solubilisatoren genommen werden, um ein möglichst weites Anforderungsfeld abdecken zu können. Die Feineinstellung der Eigenschaften, wie z. B. der Geschwindigkeit der Freisetzung des Wirkstoffs, ging dabei weit über die üblicher Block-Copolymer-Solubilisatoren hinaus. Außerdem konnte über das *Screening* dreier strukturell sehr ähnlicher Sensibilisatoren (*m*-THPC, Chlorin E6 und Pheophorbid A) die Spezifität der Aminosäuresequenzen für die Bindung des jeweiligen Wirkstoffs gezeigt werden. Des Weiteren wurde untersucht, ob die drei solubilisierten Photosensibilisatoren in Krebszellen gelangen und auf welchem Aufnahmeweg dieses geschieht, was mit Hilfe von *in vitro* Zellversuchen, konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie und Fluoreszenzlebenszeitmessungen realisiert wurde. Alle drei mit den entsprechenden Biokonjugaten solubilisierten Photosensibilisatoren zeigten über die Messzeit eine steigende interzelluläre Konzentration. Durch die Markierung des Konjugats **PII** mit der Fluoreszenzsonde Rhodamin (**Rho-PII**) konnte in einem zweiten Fluoreszenzkanal verfolgt werden, dass sowohl *m*-THPC als auch das Konjugat in das Zellinnere gelangen. Für das Konjugat zeigte sich dabei eine punktuelle Verteilung im Zytoplasma, was auf eine Lokalisation in Endo- und Lysosomen schließen lässt. Die homogene Verteilung im Zellinneren, sowie Messungen der Fluoreszenzlebenszeit deuten darauf hin, dass sich der Wirkstoff relativ schnell von seinem Transporter löste und in das Zytoplasma diffundierte. Somit scheint der Wirkstoff mit den Konjugaten in die Zellen geschleust worden zu sein und wurde dort freigesetzt, was eine effektive photodynamische Therapie der Krebszellen verspricht.

5. Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse können die Basis für Optimierungen und weitergehende Forschung darstellen. So beschränkt sich die Methodik des *Screenings* bisher auf niedermolekulare Wirkstoffe, welche intrinsische Fluoreszenz besitzen. Daher wäre es wünschenswert, für das *Screening* nicht fluoreszierender Wirkstoffe die Methodik auf die Nutzung anderer Mikroskopie-Methoden, wie IR- oder Raman-Mikroskopie, ausweiten. Außerdem wäre eine Beschleunigung und Automatisierung des *Screening*-Prozesses

wünschenswert, um einen größeren Sequenzraum testen zu können. Eine Möglichkeit zur Optimierung des Verfahrens wäre die Spaltung des C-terminalen Methionin-Restes durch Cyanbromid mit Hilfe eines Mikrowellenreaktors.^[261] Denkbar wäre auch die Anpassung des Systems, um mit der Fluoreszenzaktivierten-Zellsortierung (FACS) große Mengen an Bibliothekspartikeln zu messen und zu sortieren. Um den Schritt der Isolation einzelner Partikel für die Abspaltung und Sequenzierung des Peptidmaterials komplett unnötig zu machen, könnten gekoppelte Fluoreszenzmikroskopie-MALDI-MS-Systeme und photolabile Linker-Moleküle verwendet werden. Des Weiteren wäre es interessant, den Prozess der trans-Solubilisierung des Gastmoleküls (*m*-THPC) zu BSA weiter zu untersuchen. Dafür würden sich Methoden wie die Fluoreszenzpolarisation oder Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (engl.: *Fluorescence Correlation Spectroscopy*, FCS) anbieten.

In Anbetracht der Struktur der verwendeten Biokonjugate könnte die Konjugation anderer Polymer-Blöcke als PEO an die peptidischen Bindungsdomänen interessant sein. Möglich wären Polypeptide wie Polyglutaminsäure, bioabbaubare Polylactide (PLA)^[262] oder Pseudopolypeptide wie Poly(2-oxazoline) (POx), welche eine vergleichbare Biokompatibilität und einen Tarnkappeneffekt wie PEO, aber zusätzlich thermoresponsive Eigenschaften besitzen.^[263] Bezogen auf *in vitro* Zellversuche wäre es weiterhin interessant, die Phototoxizität der solubilisierten PS an Krebszellen, z. B. über Zellvitalitätstest wie dem MTT-*Assay*, zu untersuchen.^[264] Für die Aufnahme der Wirkstoff / Konjugat-Komplexe über Endozytose wären das Anfärben der Lysosomen mit einem geeigneten Marker (Lysomarker) und die Verfolgung der Kolo-kalisation von Rhodamin-markierten Konjugaten mit diesem Marker über CLSM ein zusätzlicher Beweis. Ein weitreichender Schritt wäre, die Biodistribution, Bioverfügbarkeit, Tumorselektivität und Abbaugeschwindigkeit der solubilisierten PS *in vivo*, z.B. in Mausmodellen, zu testen. Die intravitale Echtzeitkonfokal-Laser-Scanning-Mikroskopie (Engl.: *Intravital Real-time Confocal Laser Scanning Microscopy*, IVRTCLSM) würden sich dafür anbieten.^[265,266] Zu guter Letzt könnten Fortschritte in der Entwicklung sequenzspezifischer Polymere dazu dienen, die hier verwendeten Peptide zu ersetzen und über das vorgestellte *Screening*-Verfahren gewonnene Informationen direkt auf synthetische Polymere übertragen zu lassen. Damit könnten Nachteile der Biokonjugate, wie proteolytischer Abbau im Körper überwunden werden.

6. Experimenteller Teil

6.1. Chemikalien und Lösemittel

Die *N*- α -Fmoc geschützten Aminosäuren Fmoc-6-Ahx-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, sowie 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU), Benzotriazol-1-yl-oxyltripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) und *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP, > 99,9 %, peptide synthesis grade) wurden wie von *IRIS Biotech GmbH* (95615 Marktredwitz, Deutschland) erhalten genutzt. *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA, peptide grade), Piperidin (peptide grade), Trifluoressigsäure (TFA, peptide grade) wurden von *Acros Organics (Thermo Fisher Scientific, B-2440 Geel, Belgien)* erhalten und vor der Verwendung destilliert. Triethylsilane (TES, > 98 %) wurde von *Alfa Aesar* (76185 Karlsruhe, Deutschland) und *Tris*(2-Carboxyethyl)phosphin-hydrochlorid (TCEP, > 98 % für Biochemie), Essigsäureanhydrid (≥ 99 %), sowie Guanidin-hydrochlorid (99,5 %) wurden von der *Carl Roth GmbH* (76185 Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Dichlormethan (DCM, *IRIS Biotech GmbH*, peptide grade) wurde vor der Verwendung über CaH₂ destilliert. Bromcyan (BrCN, 97%), 1,2-Ethandithiol (EDT), Bovines Serumalbumin (Fraktion V, > 96 %), *DL*-Dithiothreitol (DTT, > 99 %), Iodessigsäure (> 99 %), Palmitinsäure (≥ 99 %), Pluronic®/Lutrol® F68 (Poloxamer 188), Rhodamin B (> 95 %, HPLC) 5,10,15,20-Tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin (> 90 %, HPLC) wurden verwendet wie von *Sigma Aldrich* (St. Louis, MO 63103, USA) erhalten. Chlorin E6 (Ce6) und Pheophorbid A (Pba) wurden von *Frontier Scientific, Inc.* (Logan, UT 84323, USA) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

m-Tetrahydroxyphenylchlorin (*m*-THPC) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Mathias O. Senge (School of Chemistry, SFI Tetrapyrrole Laboratory, Trinity College Dublin, Irland) zu Verfügung gestellt. Der Fmoc-geschützte Disulfid-Linker (Fmoc-Cystaminsuccinat)^[248] wurde freundlicherweise von Dr. Daniela Ponader und Prof. Dr. Laura Hartmann (Abteilung für Biomolekulare Systeme, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung (14424 Potsdam-Golm, Deutschland)) zur Verfügung gestellt.

Für die automatisierte Peptidsynthese von Peptid-PEO-Konjugaten wurde *Tentagel N NH₂ PEO 850 g/mol* Harz (Beladung: 0.54 mmol/g), *Tentagel PAP-NH₂ PEO 3200 g/mol* Harz (Beladung: 0.27 mmol/g) und *Tentagel PAP-NH₂ PEO 5200 g/mol* Harz (Beladung: 0.17 mmol/g) von *Rapp Polymere GmbH* (72072 Tübingen, Deutschland) verwendet. Die manuelle Synthese der Peptidbibliotheken wurde an Aminomethyl-*ChemMatrix*[®]-Harz (Beladung: 1 mmol/g) von *Sigma Aldrich* durchgeführt. Das Fragment von **PII-ds (PII(1-4)CDS)** wurde automatisiert an einem *Fmoc-Rink Amid AM* Polystyrol-Harz (Beladung: 0.63 mmol/g) von *IRIS Biotech GmbH* synthetisiert. *Spectra / Por Biotech CE* Dialyseschläuche mit 500 – 1000 g/mol und 100 – 500 g/mol Ausschlussgrenze (engl. *Molecular weight cut-off*, MWCO) wurden von *Spectrum Laboratories, Inc.* (Los Angeles, CA, USA) bezogen.

6.2. Synthese der *Split&Mix*-Peptidbibliotheken

Die Peptid-Bibliotheken (**Bib1** und **Bib2**, **Abbildung 51**) für das Screening gegen die niedermolekularen Wirkstoff-Kandidaten wurden an der festen Phase in Form eines Aminomethyl-*ChemMatrix*[®]-Harzes (Beladung: 1.0 mmol/g) synthetisiert.^[49,267] Dabei wurden die einzelnen Aminosäuren manuell nach der Fmoc-Strategie in einem 1.5 mmol Maßstab gekuppelt. Die Größe des Ansatzes wurde dabei so gewählt, dass er eine ausreichende Anzahl an Harzkügelchen (ca. 1.4×10^6) besaß, um mindestens eine Kopie jeder theoretisch möglichen Aminosäuren-Kombination (ca. 0.8×10^6) der Bibliothek zu ermöglichen. Als erstes wurde die Linker-Sequenz Gly-Gly-Met an das Festphasenharz gekuppelt, indem die entsprechende Fmoc-geschützte Aminosäure (5 äq., 7.5 mmol) mit PyBOP (5 äq., 7.5 mmol) und DIPEA (10 äq., 15 mmol) in NMP gelöst und zu dem in einem Pfeifenreaktor befindlichen Harz gegeben wurde. Der Ansatz wurde jeweils bei Raumtemperatur über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde das Harz gewaschen (5 × NMP, 5 × DCM, 5 × NMP) und nicht vollständig abreagierte Aminofunktionen mit einer Lösung aus 10 % (v/v) Essigsäureanhydrid und 10 % (v/v) DIPEA in NMP acetyliert (2 × 10 min). Nach einem weiteren Waschschrift (5 × NMP, 5 × DCM, 5 × NMP) wurde die Fmoc-Schutzgruppe der neu gekuppelten Aminosäure mit 20 % Piperidin in NMP (3 × 10 min) entfernt und nach einem finalen Waschschrift (5 × NMP, 5 × DCM, 5 × NMP) die nächste Aminosäure an das Harz gekuppelt. Für die Synthese des auf die Linker-Sequenz folgenden randomisierten Abschnitts der Aminosäuresequenz wurde das Festphasenharz für die

Kupplungsschritte in sieben gleich große Aliquote unterteilt. Darauf folgte für jedes Aliquot jeweils die Reaktion mit einer der sieben ausgewählten Fmoc-geschützten Aminosäuren (Gly, Leu, Ser, Phe, Glu, Gln, Lys, je 5 äq., 1.07 mmol) mit PyBOP (5 äq., 1.07 mmol) und DIPEA (10 äq., 2.14 mmol) in NMP über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurden für die Waschschritte, die Acetylierung und die Fmoc-Entschützung (siehe oben) die Aliquote vereint, um eine Vermischung der Harzkügelchen zu erreichen. Für den nächsten Kupplungszyklus wurde das Harz wieder aufgeteilt. Das Verfahren des Aufteilens und Durchmischens wurde wiederholt, bis die gewünschte Bibliotheksgröße (7^7 verschiedene Peptide) erreicht wurde. Zuletzt wurde das vereinigte Festphasenharz mit einer Mischung aus 94 % TFA, 2.5 % TES, 2.5 % EDT, 1 % deionisiertem Wasser behandelt, um die Seitenketten-Schutzgruppen der auf dem Harz immobilisierten Peptide zu entfernen, gefolgt vom Waschen des Harzes mit DCM und Trocknung *in vacuo*.

Die Synthese der Bibliothek **Bib2** (**Abbildung 51B**) erfolgte ebenfalls wie oben beschrieben. Den einzigen Unterschied stellte der Einbau des Disulfid-Linkers (Fmoc-Cystaminsuccinat, CDS) dar, welcher mit 3 äq. Überschuss (0.64 mmol) zusammen mit 4 äq. PyBOP (0.86 mmol) und 8 äq. DIPEA (1.71 mmol) in NMP für 4 h bei RT gekuppelt wurde. Der Erfolg der Kupplung des Linkers wurde mit einem Kaiser-Test überprüft. Dafür wurde je ein Tropfen einer Lösung von 500 mg Ninhydrin in 10 mL 95 % Ethanol, 40 g Phenol in 10 mL 95 % Ethanol und 2 mL 0.001 M KCN-Lösung mit 98 mL mit Pyridin zu einem kleinen Aliquot des Harzes gegeben. Anschließend wurde 30 Sekunden auf 80 °C erwärmt und auf blau-violette Färbung überprüft. Bei ausbleibender Verfärbung war die Kupplung quantitativ. Fmoc-Entschützung und Waschschritte wurden wie bisher durchgeführt.

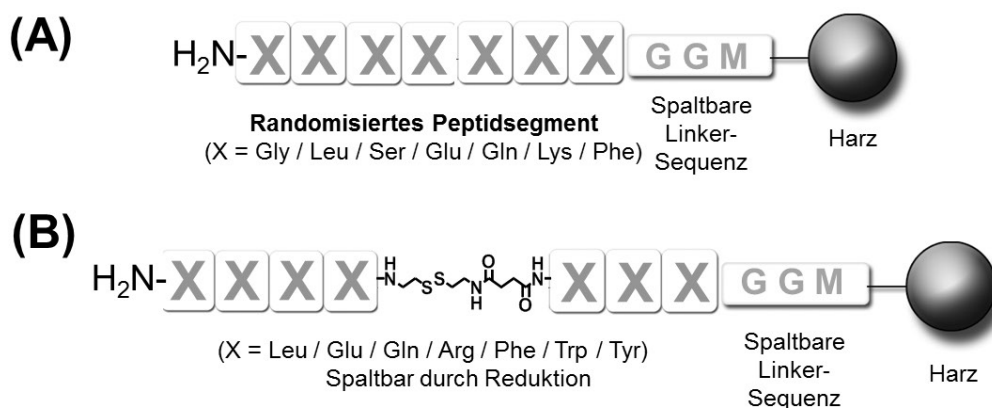


Abbildung 51. Aufbau der immobilisierten Peptide Bib1 (A) und der spaltbaren Peptidbibliothek Bib2 (B) für das Screening gegen niedermolekulare Wirkstoffkandidaten.

6.3. Screening der Peptidbibliotheken

Die immobilisierten Peptidbibliotheken wurden jeweils mit einer Lösung der Wirkstoffe in einer Mischung aus Wasser und Ethanol (9:1 v/v, für *m*-THPC, Chlorin E6, Pheophorbid A) für 72 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Harz mehrmals vorsichtig mit Ethanol gewaschen und filtriert. Sofern nötig wurde das Harz über Nacht in einer Wasser/Ethanol-Mischung (1:1 v/v) gelagert, um unspezifisch gebundenen Wirkstoff zu entfernen. Die Anreicherung der Wirkstoffe an einzelnen Harzkügelchen, welche eine Peptidsequenz mit hoher Bindungsaffinität zu dem entsprechenden Wirkstoff an ihrer Oberfläche trugen, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt (vgl. Kapitel 7.1, **Abbildung 65 - 69**). Dafür wurde ein *Zeiss Axio* Fluoreszenzmikroskop (*Carl Zeiss MicroImaging GmbH*, 07745 Jena, Deutschland), bestehend aus einer *Axio Observer.A1* Plattform mit einer *HAL 100* Durchlichtquelle, einer *AxioCam MRm* und einer *HXP 120C* Quecksilberdampfampe (*Leistungselektronik Jena GmbH*, 07747 Jena, Deutschland), genutzt. Die intrinsische Fluoreszenz von *m*-THPC, Chlorin E6 und Pheophorbid A wurde angeregt und aufgezeichnet durch ein *Zeiss filter set 50* (Anregung: 620 – 650 nm, Emission: 660 – 710 nm). Aufnahmen wurden mit dem *Zeiss AxioVision* Softwarepaket (Version 4.8.2) aufgezeichnet und ausgewertet.

6.4. Isolierung von positiven Treffern und Abspaltung vom Harz

Unter dem Mikroskop identifizierte, fluoreszierende Harzkügelchen wurden mit einer Mikropipette aus der Suspension entnommen und einzeln in 0.2 mL PCR-Zentrifugen-Gefäße überführt. Das jeweilige Peptidmaterial wurde mit 20 µL einer Lösung aus Bromcyan (20 mg/mL) in 0.1 M HCL über Nacht bei Raumtemperatur vom festen Träger abgespalten. Die erhaltenen Lösungen wurden gefriergetrocknet und die Rückstände acetyliert, um Gln und Lys in der massenspektrometrischen Untersuchung unterscheiden zu können. Dafür wurden die jeweiligen Rückstände in Aceton (40 µL) gelöst, eine Mischung aus Essigsäureanhydrid und Essigsäure (10 µL, 1:1 v/v) hinzugegeben und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden 20 µL Acetonitril / Wasser (1:1 v/v) mit 0.1 % TFA hinzugegeben, Aceton mit einem Argon-Strom entfernt und die Lösungen erneut gefriergetrocknet. Die Rückstände wurden in 10 µL Acetonitril / Wasser (1:1 v/v) + 0.1 % TFA gelöst und ohne weitere Aufreinigung der Analyse im MALDI-ToF-MS/MS zugeführt.

6.5. Sequenzierung mittels MALDI-ToF-MS/MS-Spektrometrie

Die Sequenzierung der gefundenen positiven Treffer erfolgte an einem 5800 MALDI ToF/ToF System der Firma *AB SIEX* (Framingham, MA 01701, USA), ausgestattet mit einem Neodym-dotierten Yttrium-Lithium-Fluorid (Nd:YLF) Laser (349 nm, 1000 Hz Arbeitsfrequenz). Je 1 µL der Peptidlösungen wurde zusammen mit 1 µL α -Cyano-4-hydroxymizinsäure (5 mg/mL) gelöst in Acetonitril / Wasser (0.65 : 0.35, v/v) + 0.3 % TFA als Matrix auf die MALDI Probenplatte aufgetragen und an der Luft getrocknet. Einfache MALDI-ToF-Massenspektren wurden im positiven Reflektron-Modus als ein Mittelwert aus 4000 Laserschüssen aufgezeichnet. Im Anschluss an die MS-Messungen wurden Vorläufer-Ionen nach festgelegten Kriterien (je die fünf intensivsten Peaks, Signal-Rausch-Verhältnis > 20) automatisch ausgewählt. Für die Aufzeichnung der Fragmentierungsspektren (MS/MS) wurden 5000 Laserschüsse verwendet, wobei das Massenfenster der Vorläuferionen auf 200 Halbwertsbreite (engl.: *Full Width at Half Maximum*, FWHM) gesetzt war, die Kollisionsenergie 1 keV betrug und Luft als Kollisionsgas verwendet wurde. Die Software *GPS Explorer* (Version 3.6, *Applied Biosystems, Life Technologies Corp.*, Carlsbad, CA 92008, USA) wurde für die Datenbearbeitung und -auswertung verwendet. Die Datenbanksuche erfolgte an einem *MASCOT* Server (Version 2.2, *Matrix Science Ltd.*, London W1U 7GB, UK), welcher eine

für diesen Zweck angelegte Datei mit dem vollständigen Sequenzraum aller theoretisch möglichen Aminosäuresequenzen der jeweiligen Bibliothek enthielt (823.543 verschiedene Sequenzen). Der Disulfid-Linker der **Bib2** wurde dabei als unnatürliche Aminosäure an Position 5 der Bibliothek mit der Masse 252.35 g/mol definiert. Die Ergebnisse der MS/MS-Sequenzierungen sind in den **Tabelle 18 - 22** und den **Abbildung 70 - 74** (Kapitel 7.2) zusammengefasst.

6.6. Synthese von Peptid-PEO-Konjugaten

Peptid-PEO-Konjugate wurden mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese an einem *ABI 433a* Peptid-Synthesizer (*Applied Biosystems*, Foster City, CA 94404, USA) nach Standard *ABI-Fastmoc* Protokoll (Einfachkupplung) mit NMP als Lösemittel hergestellt. Als feste Phase wurde ein *Tentagel-PAP*-Harz (*Rapp Polymere GmbH*, 72072 Tübingen, Deutschland) verwendet. Die Harze tragen jeweils α -Hydroxy- ω -amino-funktionalisiertes PEO mit einem mittleren Molekulargewicht von 8.5×10^2 g/mol (Beladung: 0.54 mmol/g), 3.2×10^3 g/mol (Beladung: 0.27 mmol/g) bzw. 5.2×10^3 g/mol (Beladung: 0.17 mmol/g), welche über ein säurelabiles Benzylether Linker-Molekül mit dem Harz verbunden sind. Der schrittweise Aufbau der Polypeptide erfolgte nach dem HBTU/NMP/Piperidin-Protokoll (**Tabelle 14**). Die Fmoc-Entschützung wurde mittels eines UV/VIS-Detektors (Series 200, *Perkin Elmer Life and Analytical Sciences*, Shelton, CT, USA) durch Detektion des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes quantifiziert. Die fertigen Konjugate wurden mit einer Mischung aus 95 % TFA, 4 % TES und 1 % Wasser durch Schütteln für 3 h bei RT vom festen Träger gespalten. Das Harz wurde filtriert, mehrmals mit TFA gewaschen und die vereinigten Überstände *in vacuo* eingeengt. Anschließend wurden die Konjugate in kaltem Diethylether ausgefällt, zentrifugiert (20 min, 9000 rpm) und die Überstände durch Abdekantieren entfernt. Zur weiteren Reinigung von Nebenprodukten der Abspaltung wurden die Niederschläge erneut in 1 – 2 mL TFA gelöst, in Diethylether gefällt und zentrifugiert (s.o.). Daraufhin wurden die Niederschläge in deionisiertem Wasser mit 1 % Guanidin-Hydrochlorid gelöst, mit 1 M NaOH neutralisiert und gegen deionisiertes Wasser dialysiert (100 – 500 g/mol und 500 – 1000 g/mol MWCO, Zelluloseester). Zuletzt wurden die Konjugat-Lösungen gefriergetrocknet.

Tabelle 14. Standardprotokoll für Einfach-Kupplung (ohne Acetylierung, Fastmoc ABI) während der automatisierten Peptidsynthese am *ABI 433a* Peptid-Synthesizer.

Modul	Reagenzien	Zeit
Fmoc-Abspaltung	1 mL 20 % Piperidin in NMP	2×1.45 min
Waschen	2.5 mL NMP	4×0.63 min
Lösen und Aktivierung der Aminosäure	1 mmol Fmoc-Aminosäure-OH 0.9 mmol 0.45 M HBTU in NMP 1 mL 2 M DIPEA in NMP	9.7 min
Kupplung	s.o.	45 min

Die unnatürliche Aminosäure Fmoc-6-Ahx-OH und das zweifach Fmoc-geschützte Lysin (Fmoc-Lys(Fmoc)-OH) der Konjugate **PII-ahx-PII** und **PII₂-K-PII** konnten ohne Modifikation des Standardprotokolls *Fastmoc ABI* am *ABI 433a* Peptid-Synthesizer gekuppelt werden.

Bei den spaltbaren Konjugaten **PI-ds** und **PII-ds** wurde zunächst das C-terminale Trimer-Segment wie oben beschrieben automatisiert gekuppelt (PAP-Harz, 3.2×10^3 g/mol PEO). Anschließend wurde das Harz nach der Fmoc-Entschützung und Waschschritten aus dem Synthesizer entnommen, mit DCM in einen Spritzenreaktor überführt, in NMP gequollen und der Disulfid-Linker (CDS) manuell gekuppelt.^[248,268] Dafür wurden 4 äq. Linker, 4 äq. PyBOP und 8 äq. DIPEA in NMP verwendet. Das Harz wurde daraufhin für 3 h bei RT geschüttelt, gewaschen und mittels Kaiser-Test auf Vollständigkeit der Kupplung überprüft. Anschließend wurde die N-terminale Tetramer-Sequenz von **PI-ds** und **PII-ds** wieder automatisiert gekuppelt.

Die Aminosäuresequenz des mit Rhodamin markierten Konjugats **Rho-PII** wurde zunächst wie bereits beschrieben automatisiert an PAP-Harz (3.2×10^3 g/mol PEO) gekuppelt. Nach finaler Fmoc-Entschützung und einem Waschschriff wurde das Harz aus dem Synthesizer entnommen, mit DCM in einen Spritzenreaktor überführt und in NMP gequollen. Anschließend wurde eine Lösung aus 10 äq. Rhodamin B, 10 äq. PyBOP und 20 äq. DIPEA in NMP aufgezogen und der Spritzenreaktor über Nacht bei RT geschüttelt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels Kaiser-Test überprüft. Die N-terminale Kupplung von Palmitinsäure bei **Pal-PII** wurde ebenfalls nach diesem Protokoll durchgeführt.

6.7. Charakterisierung der Peptid-PEO-Konjugate

Die Peptid-PEO-Konjugate wurden mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie, ^1H -Kernspinresonanz-Spektroskopie (engl.: *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) und Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie charakterisiert. MALDI-ToF-MS-Spektren wurden an einem 5800 MALDI ToF/ToF System der Firma *AB SCIEX* (Framingham, MA 01701, USA) wie zuvor beschrieben (ohne Fragmentierung) oder an einem *Autoflex III Smartbeam* der Firma *Bruker Daltonics Inc.* (Billerica, MA 01821, USA) gemessen. ^1H -NMR-Spektren wurden an einem *Bruker AV 500* Spektrometer bei 500 MHz in deuterierter TFA bei RT gemessen. FT-IR-Spektren wurden an einem *FT/IR-4200* Fourier-Transform-Infrarotspektrometer (Golden gate) der Firma *Jasco* (Easton, MD 21601, USA) oder einem *Bruker Vertex 70v* aufgezeichnet.

6.8. Bindungs-Studien / Modellierung

Die dreidimensionalen Strukturen der Peptid-Segmente von **PI** – **PIII**, **PI-ds**, **PII-ds**, **PI_{Ce6}**, **PII_{Ce6}**, **PI_{Pba}** und **PII_{Pba}** wurden mit der Software CORINA^[226] erstellt und manuell an die Struktur von *m*-THPC andockt. Anschließend wurde die Energie der Peptid / *m*-THPC-Komplexe mittels der MAB-Kraftfeld-Methode (engl.: *MAB force field*) als Teil des Computerprogramms MOLOC^[227] minimiert, wobei die Koordinaten von *m*-THPC fixiert blieben. Für die Modellierung wurde die PEO-Kette vernachlässigt und durch ein Ethylen-Oxid-Monomer ersetzt.

Für die Peptide von **PI** und **PII** wurde ein Hauptbindungsmotiv gefunden, bei dem sich die Peptide in einer linearen Konformation quer in eine der zentralen Vertiefungen der Struktur von *m*-THPC einpassten (vgl. Kapitel 3.3.2, **Abbildung 20**). Dabei wurden günstige Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Seitenketten von Phenylalanin-Resten und dem aromatischen Grundgerüst bzw. den Hydroxyphenyl-Substituenten des Wirkstoffs ausgebildet. Parallele, versetzt-parallele und T-förmige π - π -Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren Phe₂, Phe₃, Phe₅ und Phe₆ waren zu beobachten. Die Seitenkette der Aminosäure Glu₄ von **PI** ist in eine starke Wasserstoffbrückenbindung mit einer der phenolischen Hydroxylgruppen von *m*-THPC ($d(\text{O}\cdots\text{O}) = 3.02 \text{ \AA}$) involviert. Diese stellt sicher, dass der Peptid / *m*-THPC-Komplex zusätzlich durch zahlreiche nichtkovalente Wechselwirkungen stabilisiert wird. Die Seitenkette von Leu₄ von **PII** ist auf eine ähnliche Weise in eine

vorteilhafte hydrophobe Wechselwirkung mit dem aromatischen System von *m*-THPC eingebunden. Zusätzlich dazu sind die Hydroxylgruppen von *m*-THPC in weitere Wasserstoffbrückenbindungen involviert. Sowohl die Seitenkette von Gln₁ ($d(\text{O}\cdots\text{O}) = 2.89 \text{ \AA}$) und das Peptid-Rückgrat bei Phe₅ ($d(\text{O}\cdots\text{O}) = 3.02 \text{ \AA}$) von **PII** sind Wasserstoffbrücken-Akzeptoren. Bei **PI** sind ebenfalls Gln₁ ($d(\text{O}\cdots\text{O}) = 2.70 \text{ \AA}$) und Phe₅ ($d(\text{O}\cdots\text{O}) = 2.95 \text{ \AA}$) in Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hydroxylgruppen von *m*-THPC verwickelt.

Ein anderes Bindungsmotiv wurde für **PIII** identifiziert (vgl. Kapitel 3.3.2, **Abbildung 20**). Die gesamte Struktur des Peptids war stärker gefaltet, wobei Aminosäuren mit polaren Seitenkettenfunktionalitäten dem hydrophoben Wirkstoff abgewandt waren. Die Aminosäuren Phe₁, Phe₂ und Phe₅ waren dabei aber wiederum in parallele, versetzt-parallele und T-förmige π - π -Wechselwirkungen mit *m*-THPC involviert und trugen am stärksten zur Stabilisierung des Peptid / *m*-THPC-Komplexes bei. Zwischen einer Hydroxylgruppe von *m*-THPC und dem ersten Sauerstoffatom des EO-Linkers wurde eine starke Wasserstoffbrückenbindung gebildet ($d(\text{O}\cdots\text{O}) = 2.82 \text{ \AA}$). Zwei schwächere Wasserstoffbrücken bildeten sich zwischen dem Rückgrat von Phe₂ ($d(\text{O}\cdots\text{O}) = 2.86 \text{ \AA}$) und der Seitenkette von Gln₄ ($d(\text{O}\cdots\text{O}) = 3.16 \text{ \AA}$).

Für die Peptidsegmente der spaltbaren Konjugate **PI-ds** und **PII-ds** wurden ebenfalls Bindungsstudien durchgeführt (vgl. Kapitel 3.5.4, **Abbildung 38**). Dabei wurde nach jeder Energieminimierung überprüft, ob sich der Torsionswinkel der Disulfid-Brücke im bevorzugten Rahmen bewegt, welcher für diese Art von Funktionalität in der *Camebridge Structural Database (CSD)* zu finden ist. Wie zu erwarten war, wurden wiederum zahlreiche hydrophobe Wechselwirkungen der aromatischen Seitenketten der C-terminalen Trimer-Sequenz von **PI-ds** (Phe₅-Phe₇) mit dem aromatischen System von *m*-THPC gefunden. Über intramolekulare T-förmige π - π -Wechselwirkungen hält Phe₅ Phe₇ in Position, während Phe₆ in einer parallel verschobenen π - π -Wechselwirkung mit einem der phenolischen Ringe von *m*-THPC steht. Phe₇ hingegen ist senkrecht zu *m*-THPC angeordnet, um von einer günstigen T-förmigen π - π -Wechselwirkung zu profitieren. Zusätzlich ist die Amid-Bindung des Disulfid-Linkers in einer Amid- π -Wechselwirkung mit einem der Hydroxyphenol-Ringe von *m*-THPC verwickelt. Bei dem N-terminalen Tetramer-Segment von **PI-ds** (Leu₁-Tyr₄) sind CH₃-Aryl- für Leu₁ bzw. CH-CH-Wechselwirkungen für Tyr₄, sowie eine parallele π - π -Wechselwirkung für Trp₂ zu finden. Gln₃ hingegen ist weder in intramolekulare

Wechselwirkungen mit anderen Aminosäuren, noch in intermolekulare Wechselwirkungen mit *m*-THPC verwickelt. Die polare Carbonsäureamidgruppe ist von *m*-THPC abgewandt und gleicht damit die sonst ungünstige Positionierung der Seitenkette aus. Zusätzlich ist die komplette Struktur von **PI-ds** mittels zweier starker Wasserstoffbrückenbindungen zu *m*-THPC verankert, zum einen bei der *N*-terminalen Aminogruppe des Peptids ($d(\text{N}^{\cdots}\text{O}) = 3.0 \text{ \AA}$), zum anderen am Sauerstoffatom der Amidbindung bei Phe₇ ($d(\text{N}^{\cdots}\text{O}) = 3.0 \text{ \AA}$).

PII-ds bindet an *m*-THPC über zwei parallele π - π -Wechselwirkungen (Tyr₄ und Trp₅) jeweils an zwei verschiedenen Seiten des zentralen Chlorin-Grundgerüsts. Außerdem verankern zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum einen den *N*-Terminus ($d(\text{N}^{\cdots}\text{O}) = 3.1 \text{ \AA}$) und zum anderen den *C*-Terminus (C=O von Leu₇, $d(\text{O}^{\cdots}\text{O}) = 2.4 \text{ \AA}$) des Peptids mit *m*-THPC. Aminosäuren mit hydrophober Seitenkette sind in CH-CH- (Phe₂, Phe₆), CH₂- π - (Phe₆) und CH₃- π -Wechselwirkungen (Leu₃) verwickelt. Die Seitenkette von Leu₁ bildet keine hydrophoben Wechselwirkungen, allerdings ist seine Amid-Bindung einem der Phenol-Ringe zugewandt. Eine weitere Amid- π -Wechselwirkung ist bei der Amidbindung zu finden, welche Trp₅ mit dem Disulfid-Linker verbindet.

Wie zuvor wurden die Strukturen der aus dem Screening der beiden Photosensibilisatoren Pheophorbid A (Pba) und Chlorin E6 (Ce6) hervorgegangenen Konjugate **PI_{Ce6}**–**PII_{Ce6}** / **PI_{Pba}**–**PII_{Pba}** ebenfalls mit der Software CORINA erzeugt und manuell an die jeweiligen Wirkstoffe angedockt (vgl. Kapitel 3.6, **Abbildung 45**). Anschließend wurde wiederum die Energie mit der MAB-Kraftfeld-Methode (engl.: *MAB force field*) der Software MOLOC minimiert (siehe oben).

Den Simulationen nach zu urteilen ist eine zangenartige Bindung von **PI_{Pba}** zu Pba wahrscheinlich aufgrund von π - π -Wechselwirkungen von Phe₄ und Amid- π -Wechselwirkungen von Gln₇ zu zwei verschiedenen Schlüsselpositionen von Pba. Der andere aromatische Rest (Phe₁) ist in eine hydrophobe Wechselwirkung mit einem der Methyl-Substituenten von Pba verwickelt. Gln₅ hingegen hilft **PI_{Pba}** und Pba zu verankern, indem es vorteilhaft in der Mitte der Peptidkette positioniert ist. Hier bildet seine Amid-Seitenkette zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit der einzigen Carboxylgruppe von Pba ($d(\text{N}^{\cdots}\text{O}) = 3.1 \text{ \AA}$, $d(\text{N}^{\cdots}\text{O}) = 3.2 \text{ \AA}$). Die Seitenkette von Gln₂ hingegen ist dem

umgebenden Lösemittel zugewandt, wobei allerdings einige hydrophobe Kontakte des Ethylen-Restes der Seitenketten von Gln₂ und Phe₄ möglicherweise zur richtigen Positionierung von Phe₄ beitragen. Während Leu₆ mehrere intra- und intermolekulare hydrophobe Wechselwirkungen mit einem Methyl- und dem Propionsäure-Substituenten eingeht, ist Leu₃ dem Lösemittel zugewandt. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Ausbildung eines Komplexes mit strenger 1:1-Stöchiometrie zwischen Wirkstoff und Peptid eher unwahrscheinlich ist.

Für **PII_{Pba}** / Pba konnte kein zangenartiger Komplex modelliert werden. Insgesamt scheint der Komplex auch weniger dicht gepackt zu sein, als es bei **PI_{Pba}** / Pba der Fall war, auch wenn diverse günstige nichtkovalente Wechselwirkungen mit Pba zu beobachten sind. Pba ist mit **PII_{Pba}** über zwei H-Brücken mit den Seitenketten von Lys₆ ($d(\text{N}^{\cdots}\text{O}) = 3.0 \text{ \AA}$, $d(\text{N}^{\cdots}\text{O}) = 3.0 \text{ \AA}$) verankert. Der Ethylen-Substituent von Pba ist in eine CH₃- π -Wechselwirkung mit dem Phenylring von Phe₁ und einem hydrophoben Kontakt mit Leu₂ verwickelt. Des Weiteren interagieren Phe₁ und Leu₂ untereinander, was den Komplex besonders durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert. Die Seitenketten von Ser₇ und Glu₅ sind dem umgebenden Lösemittel zugewandt, daher interagieren deren Hydroxyl- und Carboxyl-Gruppen nicht direkt mit Pba. Die CH₂-Gruppen der Glu₅- und Lys₆-Seitenketten wechselwirken in intramolekularen hydrophoben Kontakten miteinander.

Der Komplex von Ce6 mit **PI_{Ce6}** ist charakterisiert durch ein weitreichendes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen. Die Anwesenheit von zwei Gln-Resten auf Position 1 und 3 des Peptids begünstigt die Wechselwirkung der Seitenketten-Amid-Funktionen von Gln₁ und Gln₃ mit den zwei Carboxyl-Funktionen von Ce6 (Gln₁: $d(\text{N}^{\cdots}\text{O}) = 3.1 \text{ \AA}$, $d(\text{N}^{\cdots}\text{O}) = 3.0 \text{ \AA}$; Gln₃: $d(\text{N}^{\cdots}\text{O}) = 2.9 \text{ \AA}$, $d(\text{N}^{\cdots}\text{O}) = 3.0 \text{ \AA}$). Währenddessen ist Phe₂ in π - π -Wechselwirkungen mit Ce6 gebunden, während Phe₆ dem Lösemittel zugewandt ist und nicht direkt mit dem Wirkstoff interagiert. Wie bereits im Fall von **PI_{Pba}** / Pba lässt das darauf schließen, dass eine strenge 1:1-Stöchiometrie zwischen Wirkstoff und Peptid eher ungünstig ist und wahrscheinlich Komplexe höherer Ordnung auftreten. Ser₅ und Gln₄ interagieren ebenfalls nicht direkt mit Ce6, allerdings trägt Gln₄ möglicherweise durch intramolekulare Wechselwirkungen zur Stabilisierung von **PI_{Ce6}** bei. Tatsächlich ist die Amid-Gruppe der Seitenkette von Gln₄ in intramolekulare H-Brücken mit zwei C=O-Gruppen des Peptidrückgrats verwickelt, während die CH₂-Gruppen der Seitenkette selbst mit Phe₂ wechselwirken.

Ein effektives Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen spielt ebenfalls eine große Rolle in der Simulation des Komplexes zwischen Ce6 und **PII_{Ce6}**. Die Seitenketten-Amid-Gruppen von Gln₁ und Gln₅ sind in starken H-Brücken mit den zwei Carboxyl-Gruppen von Ce6 verwickelt (Gln₁: $d(\text{N}\cdots\text{O}) = 3.0 \text{ \AA}$; Gln₅: $d(\text{N}\cdots\text{O}) = 3.3 \text{ \AA}$, $d(\text{N}\cdots\text{O}) = 3.0 \text{ \AA}$). Von den vier Leu-Resten von **PII_{Ce6}** sind nur Leu₃, Leu₄ und Leu₆ in hydrophobe Wechselwirkungen mit Ce6 involviert. Leu₂ und Phe₇ hingegen sind eher dem Lösemittel zugewandt und sind durch keine intramolekularen hydrophoben Kontakte stabilisiert, was ein weiteres Mal ein Hinweis auf Komplexe höherer Ordnung darstellt.

6.9. Solubilisierung von *m*-THPC, Chlorin E6 und Pheophorbid A

m-THPC wurde in EtOH (1 mg/mL, 1.47 $\mu\text{mol/L}$) gelöst, Chlorin E6 und Pheophorbid A in DMSO (1 mg/mL, 1.47 $\mu\text{mol/L}$). Von diesen Lösungen wurde je 1 mL mit 1 mL einer Lösung der entsprechenden Konjugate (1.47 $\mu\text{mol/L}$), Pluronic[®] F68 (1.47 $\mu\text{mol/L}$) oder PEO ($2.0 \times 10^2 \text{ g/mol}$, 1.47 $\mu\text{mol/L}$) in deionisiertem Wasser (pH 7) vermischt und für 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Mischungen in lq. N₂ eingefroren und *in vacuo* gefriergetrocknet. Die Rückstände wurden in deionisiertem Wasser (1 mL, pH 7) resuspendiert und die Lösungen zentrifugiert (30 min, 10.000 min⁻¹), um nicht solubilisierten Photosensibilisator abzutrennen. Daraufhin wurden UV-Vis-Absorptionsspektren der Überstände an einem Shimadzu UV-2501 PC Spektrometer (Shimadzu Corp., 604-8511 Kyoto, Japan) im Falle von *m*-THPC bzw. einem Eon Mikroplatten Spektralphotometer (BioTek Instruments GmbH, 74177 Bad Friedrichshall, Deutschland) im Falle von Chlorin E6 und Pheophorbid A angefertigt. Dafür wurden Quarzglas-Küvetten (1 mL, 10 mm Schichtdicke, Hellma Analytics, 79379 Müllheim, Deutschland) bei Messungen am Shimadzu UV-2501 PC bzw. UV 96-Loch Mikrotiterplatten (Fisher Scientific GmbH, 58239 Schwerte, Deutschland) bei Messungen am Eon genutzt.

Für die Bestimmung der Konzentration an Photosensibilisator wurden die Lösungen mit Ethanol (*m*-THPC) bzw. DMSO (Chlorin E6, Phrophorbid A) verdünnt. Damit sollte die Verschiebung und Verbreiterung von Absorptionsbanden durch Aggregation verhindert werden und die Sensibilisatoren monomolekular vorliegen. Anschließend wurde die Absorption der Sensibilisatoren bei 655 nm (*m*-THCP), 654 nm (Chlorin E6) bzw.

657 nm (Pheophorbid A) mit einer Kalibrationsgeraden des jeweiligen Sensibilisators gelöst in EtOH bzw. DMSO verglichen, um die Konzentration zu berechnen (**Tabelle 15 + 16**).

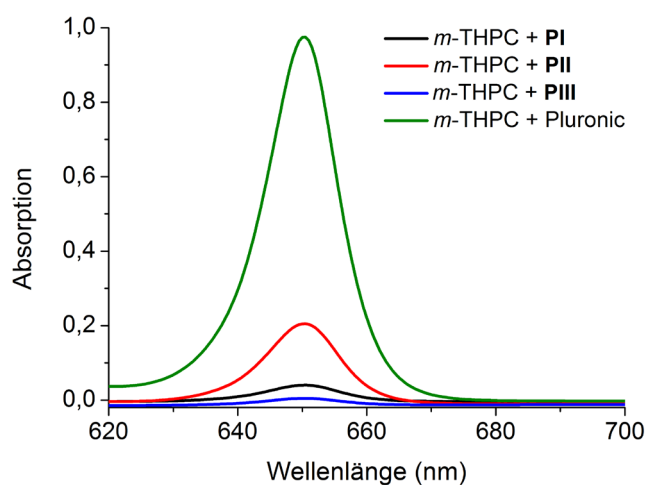


Abbildung 52. UV-Vis Absorptionsspektren (Ausschnitt) von *m*-THPC solubilisiert mit Peptid-PEO-Konjugaten **PI – III** bzw. Pluronic® F68 in Wasser / EtOH (1 : 99). Die Konzentration der Transporter war gleichbleibend (1.47 mM) und die Transporter jeweils gesättigt mit *m*-THPC. Die Spektren repräsentieren den jeweiligen maximalen Beladungsgrad der einzelnen Transporter-Systeme.

Tabelle 15. Konzentration an solubilisiertem *m*-THPC nach Inkubation und Gefriertrocknung von Transporter / Wirkstoff-Mischungen in Wasser / EtOH und Resuspension in Wasser, sowie Kontrollexperimente.

	Transporter-Konz. (mM)	Anfangs-Konz. <i>m</i> -THPC (mM)	Konz. an solubilisiertem <i>m</i> -THPC (mM)	<i>m</i> -THPC / Transporter Verhältnis
Wasser	-		n.d.	-
PEO-2000	1.47	1.47	n.d.	-
Pluronic [®] F68	1.47	2.94	2.15	1 : 0.7
PI	1.47	1.47	0.09	1 : 16
PII	1.47	1.47	0.45	1 : 3.2
PIII	1.47	1.47	0.04	1 : 37
PI_{DMSO}	1.47	1.47	0.26	1 : 5.6
PII_{DMSO}	1.47	1.47	n.d.	-
PII₈₅₀	1.47	1.47	n.d.	-
PII₅₂₀₀	1.47	1.47	0.41	1 : 3.7
PII-<i>ahx</i>-PII	1.47	1.47	0.81	1 : 1.8
PII_{2-K}-PII	1.47	1.47	1.15	1 : 1.6
<i>Pal</i>-PII	1.47	1.47	1.27	1 : 1.2
<i>Pal</i>-PEO	1.47	1.47	0.54	1 : 2.7
PI-ds	1.47	1.47	0.36	1 : 4.1
PII-ds	1.47	1.47	0.82	1 : 1.8

Tabelle 16. Konzentration an solubilisiertem Wirkstoff (Ce6, Pba und *m*-THPC) mit den Konjugaten **PI_{Ce6}**, **PII_{Ce6}**, **PI_{Pba}** und **PII_{Pba}**.

	Transporter-Konz. (mM)	Anfangs-Konz. Wirkstoff (mM)	Konz. an solubilisiertem Wirkstoff (mM)	Wirkstoff/ Transporter Verhältnis
PI_{Ce6} + Ce6	1.50	1.50	0.84	1 : 1.8
PI_{Ce6} + <i>m</i>-THPC	1.50	1.50	0.04	1 : 38
PII_{Ce6} + Ce6	1.50	1.50	0.02	1 : 75
PI_{Pba} + Pba	1.50	1.50	0.68	1 : 2.2
PI_{Pba} + <i>m</i>-THPC	1.50	1.50	0.10	1 : 15
PII_{Pba} + Pba	1.50	1.50	0.61	1 : 2.5

6.10. Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenz-Emissions-Spektren und zeitaufgelöste Fluoreszenz-Kinetiken wurden an einem *Cary Eclipse* Fluoreszenzspektrophotometer (*Varian, Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, 95051, USA) in Polystyrol Einmal-Küvetten (2 mL, 10 × 10 mm) oder einem *Synergy MX* (*BioTek Instruments GmbH*, 74177 Bad Friedrichshall, Deutschland) in schwarzen 96-Loch Fluoreszenz-Mikrotiterplatten (*Fisher Scientific GmbH*, 58239 Schwerte, Deutschland) aufgezeichnet. Im Fall von *m*-THPC zeigte keines der mit der jeweiligen maximalen Kapazität des Wirkstoffs beladenen Systeme eine nennenswerte Fluoreszenz. Um die intermolekulare Auslöschung der Fluoreszenz von *m*-THPC durch trans-Solubilisierung auf ein Zielmolekül aufzuheben, wurde zu den Proben jeweils ein Überschuss an BSA gegeben. Dafür wurde je eine Stammlösung von *m*-THPC (2 µmol/L für *Cary Eclipse*, 0.2 µmol/L für *Synergy MX*, pH 7) in deionisiertem Wasser, solubilisiert mit den verschiedenen Transportern, mit einer Lösung aus BSA in deionisiertem Wasser (200 µmol/L, pH 7) zu gleichen Volumenanteilen vermischt und sofort gemessen. Die Proben wurden dabei alle 5 min (*Cary Eclipse*) bzw. 2 min (*Synergy MX*, gain 80) bei 417 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 654 nm gegen die Zeit aufgetragen. Falls nicht anders erwähnt, wurden die Messungen bei RT durchgeführt. Die Kinetiken bei unterschiedlichen Temperaturen wurden am *Synergy MX* gemessen (vgl. Kapitel 3.3.4, **Abbildung 24**). Dafür wurde das Gerät vorher auf die entsprechende Temperatur (25 °C, 37 °C, 42 °C, 45 °C) temperiert und anschließend die Messungen durchgeführt. Des Weiteren wurde das Messintervall von 2 min auf 20 min erhöht, um Photobleichung des Farbstoffs durch häufige Anregung ausschließen zu können (**Abbildung 53**). Für Messungen bei verschiedenen pH-Werten (**Abbildung 54**) wurden alle Komponenten in 0.1 M Natrium-Phosphat-Puffer gelöst, welcher vorher mit 1 M HCL bzw. 1 M NaOH auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt wurde.

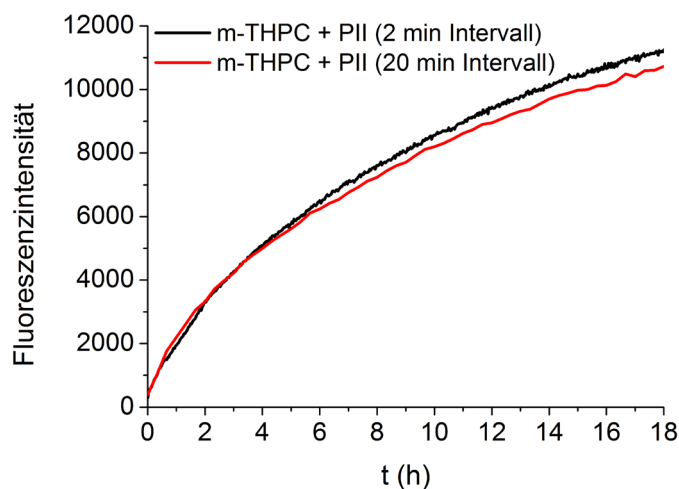


Abbildung 53. Vergleich der Entwicklung der Fluoreszenzemission über die Zeit von *m*-THPC solubilisiert in Wasser mit **PII** nach Zugabe eines Überschusses an BSA bei Anregung jeweils alle 2 min bzw. alle 20 min ($t = 0$ min entspricht der Zugabe von BSA, Bedingungen: Anregung = 417 nm, Emission = 654 nm, $c[\text{BSA}] = 100 \mu\text{M}$; $c[m\text{-THPC}] = 0.1 \mu\text{M}$).

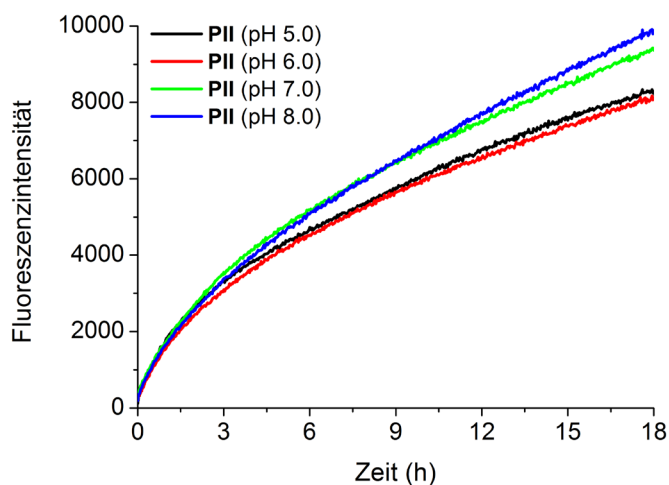


Abbildung 54. Vergleich der Entwicklung der Fluoreszenzemission über die Zeit von *m*-THPC solubilisiert in Wasser mit **PII** bei unterschiedlichen pH-Werten nach Zugabe eines Überschusses an BSA ($t = 0$ min entspricht der Zugabe von BSA, Bedingungen: Anregung = 417 nm, Emission = 654 nm, $c[\text{BSA}] = 100 \mu\text{M}$; $c[m\text{-THPC}] = 0.1 \mu\text{M}$).

Um sicherzustellen, dass die Ursache der ansteigenden Fluoreszenzemission mit der Zeit ausschließlich die Zugabe von BSA war, wurde das mit *m*-THPC beladene Konjugat **PII** unter den gleichen Messbedingungen ohne BSA fluoreszenzspektroskopisch

untersucht (**Abbildung 55**). Keine nennenswerte Emission konnte über einen Zeitraum von 18 h festgestellt werden.

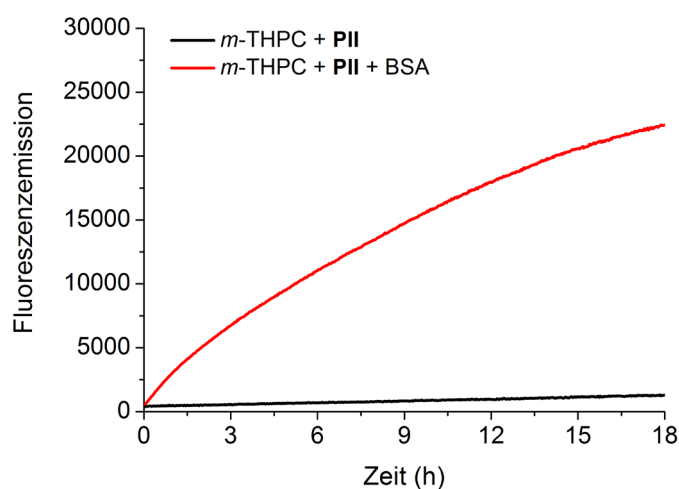


Abbildung 55. Vergleich der Entwicklung der Fluoreszenzemission über die Zeit von *m*-THPC solubilisiert in Wasser mit **PII** mit (rote Linie) und ohne (schwarze Linie) die Zugabe eines Überschusses an BSA ($t = 0$ min entspricht der Zugabe von BSA, Bedingungen: Anregung = 417 nm, Emission = 654 nm, $c[\text{BSA}] = 100 \mu\text{M}$; $c[\text{m-THPC}] = 0.1 \mu\text{M}$).

Im Gegensatz zu den Transportern, welche mit *m*-THPC gesättigt waren und der Wirkstoff somit durch intermolekulare Wechselwirkungen deaktiviert war, wurde **PII** zusätzlich mit einer geringeren Menge an Wirkstoff beladen (1 : 50 c/c). Es zeigte sich dabei, dass in diesem Fall *m*-THPC nicht vollständig deaktiviert war und eine deutliche Fluoreszenzemission bei 654 nm bereits ohne die Zugabe von BSA gemessen werden konnte (**Abbildung 56**). Das deutet darauf hin, dass die Auslöschung der Fluoreszenz und Deaktivierung bezüglich der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff aufgrund sehr hoher lokaler Konzentration an Wirkstoff innerhalb des hydrophoben Kerns der gesättigten Aggregate geschieht.

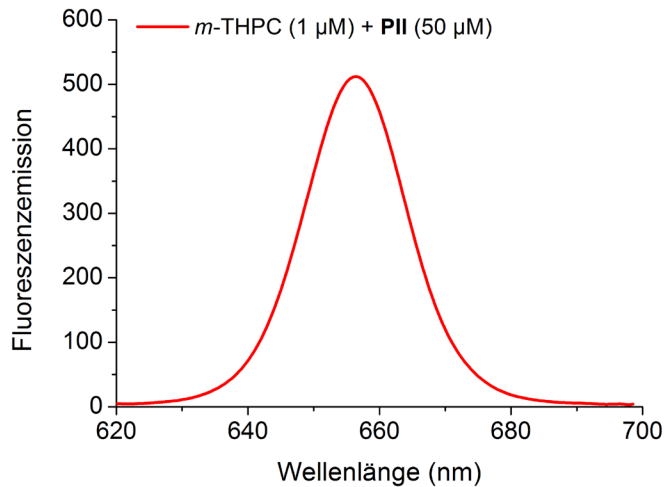


Abbildung 56. Fluoreszenzspektrum (Ausschnitt) von *m*-THPC solubilisiert in Wasser mit **PII** im Verhältnis 1:50 (c/c), wodurch **PII** nicht mit dem maximalen Beladungsgrad an Wirkstoff gesättigt ist (Anregung = 417 nm, Emission = 654 nm, $c[\text{PII}] = 50 \mu\text{M}$; $c[\text{m-THPC}] = 1 \mu\text{M}$).

Es sollte überprüft werden, ob die im Zellkultur-Medium enthaltenen Proteine denselben Effekt auf die Entwicklung der Fluoreszenzemission von solubilisiertem *m*-THPC haben, wie die Zugabe von einer BSA-Lösung. Daher wurden zu 150 µL einer Lösung von 0.2 µM *m*-THPC, solubilisiert mit **PII** in Wasser, 150 µL Zellkultur-Medium RPMI 1640 (ohne Phenolrot, mit L-Glutamin, PAA) mit 10 % FBS-Gold (PAA) gegeben und sofort die zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzemission (*Synergy MX*, Anregung: 417 nm, Emission: 654 nm) gestartet (**Abbildung 57**).

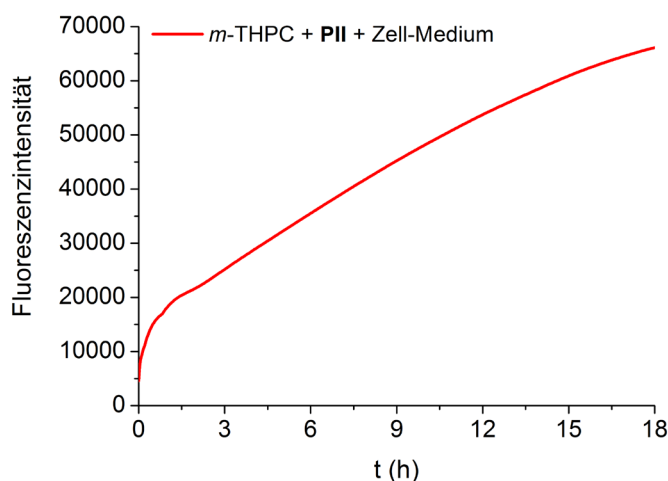


Abbildung 57. Entwicklung der Fluoreszenzemission von *m*-THPC / **PII** nach Zugabe von Zellkulturmedium (t = 0 min entspricht der Zugabe von BSA bzw. Medium, Bedingungen: Anregung = 417 nm, Emission = 654 nm; c[Medium] = 50 % v/v; c[FBS] = 5 % v/v; c[*m*-THPC] = 0.1 μ M).

Es galt bei den Aktivierungs- bzw. Freisetzungskinetiken der spaltbaren Konjugate **PI-ds** und **PII-ds** bei den Messungen der jeweils mit TCEP reduzierten Konjugate sicherzustellen, dass das Reduktionsmittel keinen Einfluss auf die Struktur des Proteins hat. Daher wurde zunächst BSA derart behandelt, dass dessen Disulfid-Brücken reduziert und anschließend alle freien Thiol-Gruppen alkyliert wurden, um eine Rückreaktion zu verhindern. Dafür wurden die Disulfidbrücken von BSA nach Literaturvorschrift mit Dithiothreitol (DTT) reduziert und anschließend die entstandenen freien Thiol-Gruppen mit Iodessigsäure alkyliert.^[269] Anschließend wurde das BSA gegen deionisiertes Wasser dialysiert (MWCO 500 - 1000 g/mol, Zelluloseester) und gefriergetrocknet.

Die Spaltung der Konjugate wurde erreicht, indem 75 μ L einer Lösung des entsprechenden Konjugats beladen mit *m*-THPC (0.4 μ M) in 0.1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7.0) mit 75 μ L einer Lösung von TCEP (20 mM, pH 7.0) in Puffer (s.o.) in einer 96-Loch Mikrotiterplatte zusammengegeben wurden. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei RT wurden 150 μ L einer Lösung von alkylisiertem BSA (20 μ M, pH 7.0) in Puffer (0.1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7.0) dazugegeben und sofort die Messung der Fluoreszenzemission (*Synergy MX*, Anregung: 417 nm, Emission: 654 nm) gestartet. Die Vergleichsmessungen ohne Reduktion der Konjugat-Disulfidbrücke wurden parallel auf

dieselbe Art behandelt, allerdings wurde Puffer (0.1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7.0) anstatt TCEP-Lösung verwendet.

Um sicherzustellen, dass die Beschleunigung der Freisetzung bei den reduzierten Konjugaten **PI-ds** und **PII-ds** ausschließlich eine Folge der Spaltung der Konjugate war, wurde mit *m*-THCP beladenes Pluronic® F68 unter denselben Bedingungen fluoreszenzspektroskopisch untersucht (**Abbildung 58**). Das Block-Co-Polymer, welches über keinerlei Disulfidbrücken verfügt, zeigte dabei keinen Effekt durch die Zugabe von TCEP.

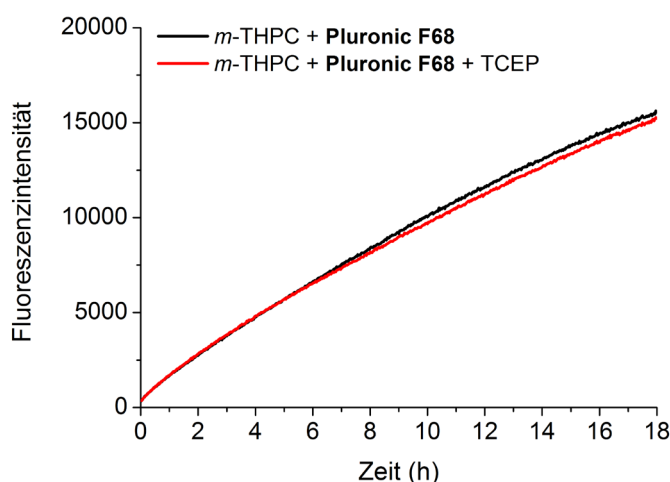


Abbildung 58. Fluoreszenzemissionskinetik von Pluronic® F68 beladen mit *m*-THCP mit (rot) und ohne (schwarz) TCEP nach Zugabe von alkyltiertem BSA ($t = 0$ min entspricht der Zugabe von BSA, Bedingungen: Anregung = 417 nm, Emission = 654 nm, $c[\text{BSA}] = 10 \mu\text{M}$; $c[\text{TCEP}] = 5 \text{ mM}$; $c[m\text{-THCP}] = 0.1 \mu\text{M}$).

Die Photosensibilisatoren Pheophorbid A (Pba) und Chlorin E6 (Ce6) wurden ebenfalls fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Dafür wurde je eine Stammlösung von Pheophorbid A bzw. Chlorin E6 ($0.2 \mu\text{mol/L}$, pH 7) solubilisiert mit **PI_{Pba}** bzw. **PI_{Ce6}** in deionisiertem Wasser mit einer Lösung aus BSA in deionisiertem Wasser ($200 \mu\text{mol/L}$, pH 7) zu gleichen Volumenanteilen vermischt und sofort gemessen (**Abbildung 59**). Gleichzeitig wurden identische Referenzproben gemessen, welche nur mit Wasser vermischt wurden. Die Proben mit Pba wurden dabei alle 2 min (*Synergy MX*) bei 400 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 668 nm gegen die Zeit aufgetragen. Die Proben mit Ce6 wurden alle 2 min (*Synergy MX*) bei 409 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 674 nm aufgezeichnet.

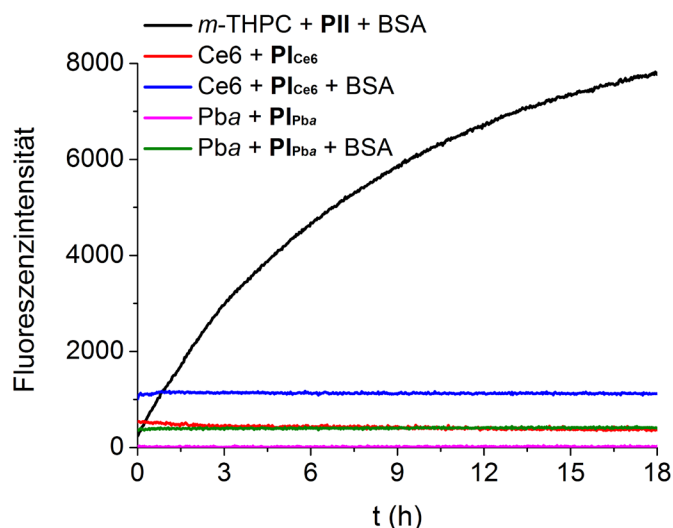


Abbildung 59. Fluoreszenzemissionskinetik von Pheophorbid A (Pba) solubilisiert mit PI_{Pba} und Chlorin E6 (Pba) solubilisiert mit PI_{Ce6} , jeweils ohne BSA und nach der Zugabe BSA verglichen mit *m*-THPC / **PII** und BSA (Bedingungen: Pba: Anregung = 400 nm, Emission = 668 nm, Ce6: Anregung = 409 nm, Emission = 674 nm, $c[\text{BSA}] = 100 \mu\text{M}$; $c[\text{Pba}/\text{Ce6}] = 0.1 \mu\text{M}$).

Es sollte der Einfluss der Fluoreszenzmarkierung mit Rhodamin B des Konjugats **Rho-PII** auf die Entwicklung der Fluoreszenz nach Zugabe von BSA im Vergleich zum Konjugat ohne Markierung (**PII**) untersucht werden. Dafür wurden Proben der jeweiligen Konjugate beladen mit *m*-THPC unter identischen Bedingungen fluoreszenzspektroskopisch (*Synergy MX*) untersucht (**Abbildung 60**). **Rho-PII** zeigte dabei eine deutlich schnellere Entwicklung der Fluoreszenz von *m*-THPC, als es bei **PII** der Fall war.

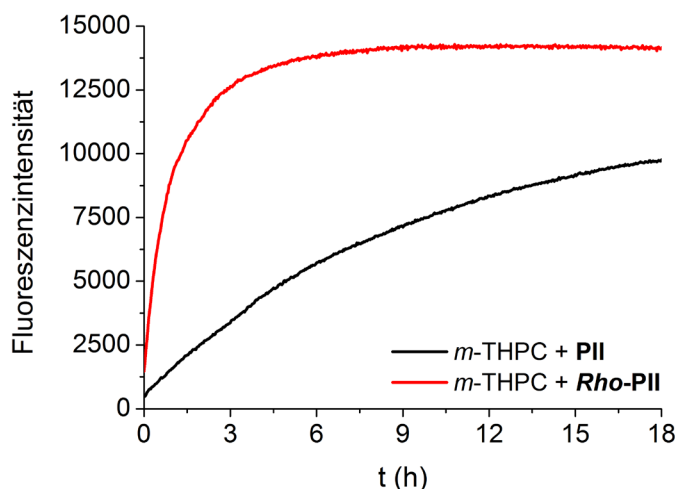
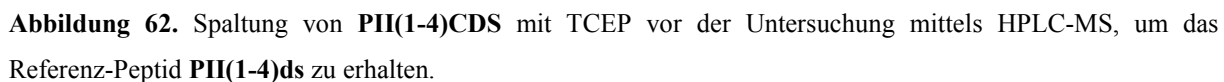
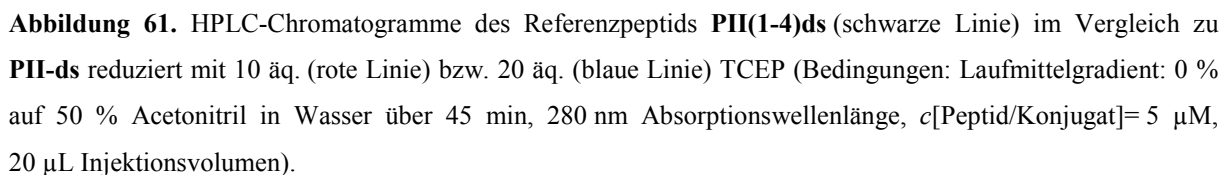


Abbildung 60. Fluoreszenzemissionskinetik von *m*-THPC solubilisiert mit **PII** (schwarz) und **Rho-PII** (rot) nach der Zugabe BSA (Bedingungen: Anregung = 417 nm, Emission = 654 nm, $c[\text{BSA}] = 100 \mu\text{M}$; $c[\text{m-THPC}] = 0.1 \mu\text{M}$).

6.11. Hochdruck-Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS)

Die Effektivität und Vollständigkeit der Spaltung von **PII-ds** mit TCEP wurde mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie-Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS) untersucht. Dabei wurde ein *LCMS-QP8000a* System (Shimadzu Corp., 604-8511 Kyoto, Japan) mit einer Phenyl-Hexyl-Säule (Luna, 3 μm Partikelgröße, 150 \times 2.00 mm, Phenomenex, Torrance, CA 90501-1430, USA) verwendet. Es wurden 20 μL Probe injiziert und ein Gradient von 0 % auf 50 % Acetonitril in Wasser über 45 min gefahren. Chromatogramme der Proben wurden bei 280 nm Absorptionswellenlänge gemessen.

Als Referenz wurde das Spaltprodukt von **PII-ds**, die *N*-terminale Tetramer-Sequenz ($\text{H}_2\text{N-LFLY-NH-CH}_2\text{-SH}$) gemessen (**PII(1-4)ds**, **Abbildung 61**). **PII(1-4)ds** wurde erhalten, indem **PII(1-4)CDS** mit TCEP reduziert wurde (**Abbildung 62**). Das Produkt wurde mittels ESI-MS charakterisiert ($[\text{H}_2\text{N-LFLY-NH-CH}_2\text{-SH}]_{\text{experimentell}} = 614.5$; $[\text{H}_2\text{N-LFLY-NH-CH}_2\text{-SH}]_{\text{berechnet}} = 613.33$). Dafür wurde eine Lösung von 5 μM **PII(1-4)CDS** in einem Acetonitril / Wasser-Gemisch (1:1 v/v) hergestellt und 20 äq. TCEP (100 μM) dazugegeben. **PII-ds** wurde in deionisiertem Wasser gelöst und mit 20 äq. bzw. 40 äq. TCEP in Wasser vermischt, um eine Endkonzentration von 5 μM Konjugat in Lösung zu erhalten. Die Reaktionszeit betrug jeweils 20 min. Bei allen drei Messungen war ein Signal bei einer Retentionszeit von 20.5 min zu erkennen, welches nahezu identische Peakflächen besaß und



6.12. Dynamische Lichtstreuung

Für **PI – III**, **PII₅₂₀₀**, **PII-ahx-PII** und **PII₂-K-PII** wurden dynamische Lichtstreuungsexperimente an einem Spektrometer, bestehend aus einem Argon-Ionen-Laser ($\lambda = 488 / 633 \text{ nm}$, Intensität: 30-600 mW; Coherent Innova 300), einem Goniometer Eigenbau, einem Einzelphotonen-Detektor (ALV SO-SIPD) und einem Multipel-Tau Digital-Korrelator (ALV-5000/FAST), durchgeführt. Die DLS-Autokorrelationsfunktion wurde bei einer Konjugat-Konzentration von $0.37 \mu\text{M}$ und einem Streuwinkel von 90° gemessen. Um den Diffusionskoeffizienten zu erhalten, wurden die Autokorrelationsfunktionen mit dem Programm FASTORT.EXE^[270] ausgewertet, welche anschließend in hydrodynamische Radien mittels der Stokes-Einstein-Gleichung umgewandelt wurden (**Tabelle 2 + 6**). Für **PI** und **PIII** ohne *m*-THPC wurden keine Strukturen $> 7 \text{ nm}$ gefunden (Detektionsgrenze des Messaufbaus). Vor der Messung wurden alle Proben durch einen Spritzenfilter ($0.45 \mu\text{m}$, Nylonmembran) filtriert, um ggf. vorhandene Staubpartikel zu entfernen.

Dynamische Lichtstreuung der spaltbaren Konjugate **PI-ds**, **PII-ds**, **PI_{Ce6}** und **PI_{pba}** wurde an einem *Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK), ausgestattet mit einem He-Ne-Laser ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$), gemessen. Die Daten wurden bei 298 K im Rückstreuungsmodus bei einem Streuwinkel von $2\theta = 173^\circ$ aufgezeichnet, welcher einem Streuvektor von $q = (4\pi n/\lambda) \sin \theta$ entspricht, wobei n den Brechungsindex von Wasser darstellt.

Die Lösungen (je 2 mL) wurden in $10 \times 10 \text{ mm}$ Polystyrol-Einwegküvetten gegen deionisiertes Wasser als Referenz gemessen. Der hydrodynamische Radius R_h (einer hydrodynamisch gleichmäßigen Kugel) wurde über den Diffusionskoeffizienten mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung $R_h = kT/6\pi\eta D$ mit der Viskosität von Wasser ($\eta = 0.938 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) bei einer Temperatur von 298 K berechnet. Jede Messung setzt sich aus je fünf Zyklen zu je 11 Durchläufen pro Zyklus und je 10 s pro Durchlauf zusammen.

Für die Messung der Konjugate ohne *m*-THPC wurden die jeweiligen Konjugate in 2 mL deionisiertem Wasser bei einer Konzentration von je 0.37 mmol/L gelöst. Konjugate beladen mit *m*-THPC wurden ebenfalls auf eine Konzentration von 0.37 mmol/L verdünnt. Bei den zu reduzierenden Proben wurden zusätzlich jeweils $20 \text{ }\mu\text{g}$ TCEP zu den Lösungen gegeben und

für 10 min bei RT geschüttelt. Alle Proben wurden vor der Messung durch einen Polyamid-Spritzenfilter (0.450 µm Porengröße) gefiltert, um Verunreinigungen zu entfernen.

6.13. Erzeugung von Singulett-Sauerstoff¹¹

Zeitaufgelöste Messungen der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff (¹O₂) wurden an einem von Schlothauer *et al.*^[271] beschriebenen Messaufbau durchgeführt, welcher auf einem NIR-Photomultiplikator *H10330* (*Hamamatsu Photonics K.K.*, Hamamatsu City, Japan) basiert. Bestrahlung erfolgte durch eine LED-Lichtquelle mit einer zentralen Wellenlänge von 425 nm, betrieben mit einer maßgefertigten Steuereinheit, welche Lichtpulse mit einer Wiederholungsrate von rund 12 kHz und einem nahezu rechtwinkligen, temporären Intensitätsprofil von 160 ns Dauer liefert. Wellenlängenselektion des emittierten Lichtes erfolgte mit einem Silizium-Kantenfilter und einem Interferenz-Bandpassfilter mit einer zentralen Wellenlänge bei 1270 nm und 30 nm Halbwertsbreite (engl.: *Full Width at Half Maximum*, FWHM). Dennoch ist ein kurzzeitiges Artefakt bei jeder Messung vorhanden, welches mehrere Gründe hat (z.B. Streuung, Lumineszenz, „Hotspots“) und niemals komplett ausgeschlossen werden kann. Daher wurde für den Fit jeweils die erste 1 µs der Messung vernachlässigt.

In einer homogenen Umgebung kann die ¹O₂-Lumineszenz üblicherweise als eine doppeltexponentielle Funktion beschrieben werden^[271-275]:

$$I(t) = (C \cdot n_T \cdot \Phi_{\Delta}) \cdot \frac{\tau_T^{-1}}{\tau_T^{-1} - \tau_O^{-1}} (\exp[-t/\tau_O] - \exp[-t/\tau_T])$$

wobei τ_T der Photosensibilisator-Triplet-Zustand und τ_O die ¹O₂-Abklingzeit darstellt. Die Amplitude, welche bestimmt wurde, besteht aus der Anzahl der anfangs im Triplet-Zustand (n_T) befindlichen Moleküle, der Quantenausbeute der ¹O₂-Erzeugung (Φ_{Δ}) und der Konstante C, welche die Detektionseffektivität des Messaufbaus wiedergibt.

Es wurde gezeigt, dass für membranlokalisierte Photosensibilisatoren eine zusätzliche Signalkomponente auftaucht, welche durch eine höhere Strahlungsratenkonstante am Ort der

¹¹ Messungen der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz wurden von Dr. Steffen Hackbarth am Institut für Physik der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt.

$^1\text{O}_2$ -Erzeugung entsteht, bevor es in das umgebende Wasser diffundiert. Für Zeiten größer als $1\ \mu\text{s}$ nach dem Puls, liefert eine erste Annäherung dieser zusätzlichen Signalkomponente einen monoexponentiellen Abfall, bestimmt durch die Triplett-Abklingzeit des Photosensibilisators. Für den Fall, dass die $^1\text{O}_2$ -Abklingzeit am Ort der Erzeugung verglichen mit der Diffusionszeit sehr lang ist, erreichen fast alle erzeugten $^1\text{O}_2$ -Moleküle die Wasserphase. Die Signalkomponente, welche aus der Wasserphase stammt, ist davon nahezu unbeeinflusst.

Daher wurde die Signalamplitude (vgl. Kapitel 3.3.5, **Abbildung 25**) ausschließlich über eine doppeltexponentielle Komponente bestimmt. Die zusätzliche monoexponentielle Komponente, welche direkt nach dem Mischen der *m*-THPC beladenen Konjugate mit BSA für kurze Abklingzeiten zu beobachten war, wurde vernachlässigt, da sie in der höheren Strahlungsratenkonstante in Aggregaten (z.B. Mizellen) begründet lag, welche über die Zeit der Inkubation mit BSA abgebaut werden.

6.14. Zellkultur¹²

Die *Jurkat*-Zellen (Klon E 6-1 Humane akute T-Zellen Leukämie) wurden in T75- oder T25-Zellkulturflaschen kultiviert. Dabei wurde alle zwei bis drei Tage die Zellsuspension mit frischem Nährmedium auf ca. 200 000 Zellen / mL verdünnt, wobei mindestens 75 % des Gesamtvolumens frisches Medium war. Alternativ wurden die Zellen zentrifugiert (3 min, $350 \times g$) und komplett in frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden bei $37\ ^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator kultiviert. Das Nährmedium wurde bei $4\ ^\circ\text{C}$ gelagert und vor der Verwendung auf $37\ ^\circ\text{C}$ in einem Wasserbad temperiert. Alle in der Zellkultur durchgeführten Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Materialien wurden mit 70 % EtOH desinfiziert bzw. es wurden sterile Pipettenspitzen und serologische Pipetten verwendet.

Das Nährmedium für die *Jurkat*-Zellen bestand aus 500 mL RPMI 1640 (ohne Phenolrot, mit L-Glutamin, PAA Laboratories, 4061 Pasching, Österreich) und 50 mL FBS-

¹² Die Zellen für CLSM- und FLIM-Experimente wurden von Dr. Annegret Preuß vom Institut für Physik der Humboldt-Universität zu Berlin kultiviert.

Gold (PAA Laboratories), welches zusätzlich mit 5 mL Penicillin / Streptomycin-Lösung (PAA Laboratories) versetzt war. Daraus ergab sich eine Konzentration von 10 % FBS, 2 mmol/L L-Glutamin, 500 µg/mL Streptomycin und 50 U/mL Penicillin im Medium.

6.15. Inkubation der *Jurkat*-Zellen

Von den mit *m*-THPC (**PII**, ***Rho*-PII**), Chlorin E6 (**PI_{CE6}**) bzw. Pheophorbid A (**PI_{Pba}**) beladenen Peptid-PEO-Konjugaten wurden jeweils Stammlösungen in deionisiertem Wasser hergestellt, welche einer Konzentration von 1 mmol/L PS (*m*-THPC, Chlorin E6, Pheophorbid A) entsprachen. Diese Lösungen wurden direkt in das Nährmedium gegeben, so dass dieses die finale Konzentration von 3 µmol/L *m*-THPC im Medium besaß. Es wurde pro Zeitpunkt und Probe je 1 mL Zellsuspension in einer Mikrotiterplatte mit 24 Kavitäten (ca. 2×10^5 Zellen) inkubiert.

Für Kontrollexperimente mit PS ohne Konjugat-Transporter wurden jeweils ethanolische Stammlösungen der PS (1 mmol/L) unter Rühren sehr langsam mit PBS verdünnt (1 : 10), bevor es in das Nährmedium gegeben wurde (**Abbildung 63**). Die Konzentration an PS im Medium betrug 3 µmol/L.

Die Inkubation der Zellen wurde unter Ausschluss von Tageslicht durchgeführt. Dafür wurde die sterile Werkbank mit einer Lichtquelle aus LEDs ausgestattet, deren orangefarbenes Licht nicht von den PS absorbiert wird und somit den Zellen keinen Schaden zufügt.

Um eine Entwicklung über die Zeit bei den CLSM- und FLIM-Messungen beobachten zu können, wurden Zellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten (1 h, 3 h, 5 h, 24 h) präpariert. Die Inkubation mit den PS / Konjugat-Komplexen wurde dabei wieder bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Vor jeder Messung wurden die Zellen zentrifugiert (3 min, 350 × g) und das Medium gegen frisches ohne PS ausgetauscht, um ausschließlich Effekte durch intrazellulären PS zu messen. Die Zellen für verschiedene Inkubationszeiten waren dabei zeitlich so angesetzt worden, dass sie unmittelbar vor der Messung gewaschen wurden und nicht mehr als 30 min zwischen Ende der Inkubation und dem Mikroskopieren lag.

6.16. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Um die Aufnahme der verschiedenen PS und des mit Rhodamin markierten Konjugats **Rho-P11** in die *Jurkat*-Zellen zeigen zu können, wurden Aufnahmen an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (engl.: *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM) der Zellen an einem *FluoViewTM FV1000* (Olympus Corporation, Tokio, Japan) zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation mit den PS / Konjugat-Komplexen angefertigt. Dafür wurde in zwei unterschiedlichen Kanälen des Fluoreszenzmikroskops jeweils die Fluoreszenz des PS und bei Bedarf die des Rhodamin-Labels verfolgt. Zusätzlich wurde je eine Streulicht-Aufnahme der Zelle aufgenommen.

Die Anregungswellenlänge für die PS und Rhodamin lag dabei bei 405 nm. Es wurde die Fluoreszenz der PS bei 650 nm aufgezeichnet, die Emission von Rhodamin bei 520 nm. Für die grafische Auswertung wurden die PS in einer Falschfärbung in Rot und Rhodamin in Grün dargestellt. Es wurden jeweils auch Kontrollexperimente mit Rhodamin-markierten Konjugaten ohne PS und PS ohne Konjugate in EtOH durchgeführt, um Artefakte zu vermeiden.

Für das Mikroskopieren der inkubierten *Jurkat*-Zellen wurden jeweils 10 µL der Zellsuspension auf ein Deckgläschen pipettiert und mit einem zweiten Deckgläschen abgedeckt.

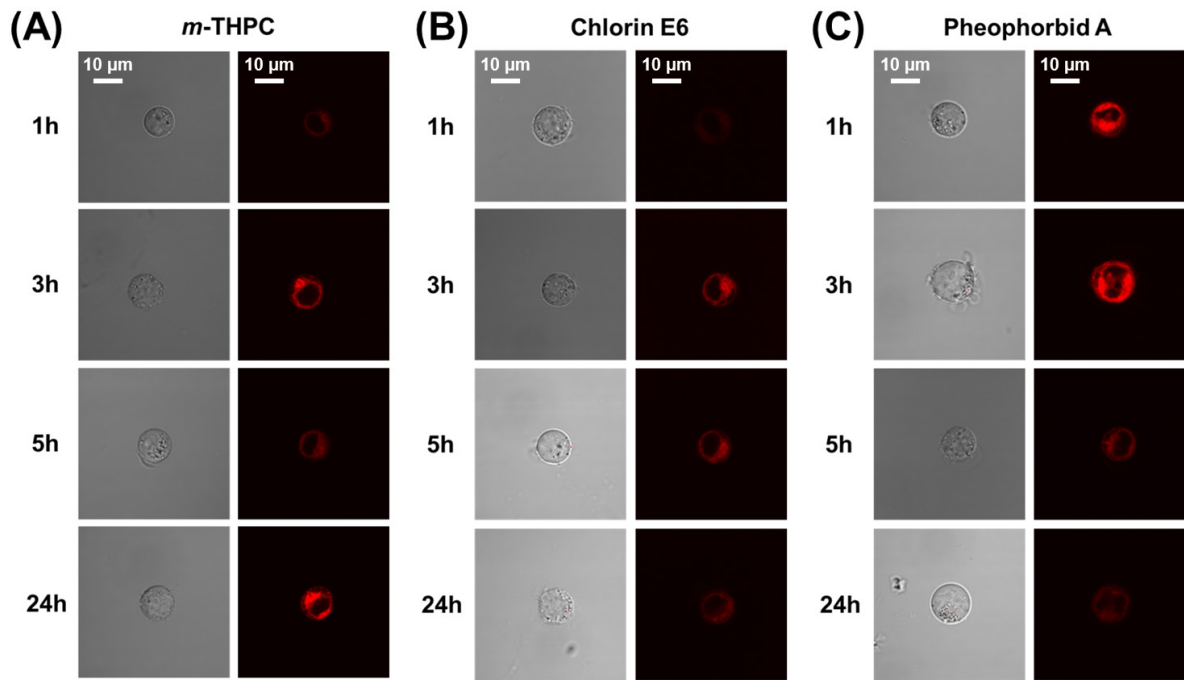


Abbildung 63: Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopieaufnahmen von *Jurkat*-Zellen inkubiert mit (A) *m*-THPC, (B) Chlorin E6 und (C) Pheophorbid A als Kontrollexperiment nach 1 h, 3 h, 5 h und 24 h Inkubationszeit im Streulicht- (links) und Fluoreszenzkanal für die PS (rechts). Bedingungen: Anregung: 405 nm, Emission: 520 nm (Rhodamin), 650 nm (PS).

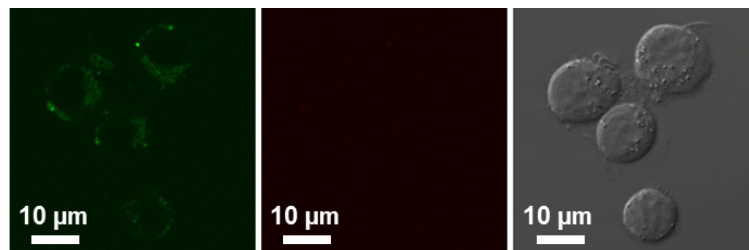


Abbildung 64: Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Aufnahmen von *Jurkat*-Zellen inkubiert mit **Rho-PII** (unbeladen) als Kontrollexperiment nach 24 h Inkubationszeit im Fluoreszenzkanal für Rhodamin (links), *m*-THPC (Mitte) und Streulichtmodus (rechts). Bedingungen: Anregung: 405 nm, Emission: 520 nm (Rhodamin), 650 nm (*m*-THPC).

6.17. Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM)

In der Abbildung der Zelle wird die Verschiebung der Fluoreszenzlebenszeit über eine Farbkodierung dargestellt, während zusätzlich noch statistische Auswertungen mittels Histogrammen möglich sind (vgl. Kapitel 3.7.3, **Abbildung 50**). Es wurden dieselben Zellen verwendet, welche auch für die CLSM unterschiedlich lange mit den PS / Konjugat-Komplexen inkubiert wurden (1 h, 3 h, 5 h, 24 h). Dafür wurde dasselbe Konfokal-Mikroskop (*FluoViewTM FV1000*, Olympus), allerdings mit einer FLIM-Erweiterung (*PicoQuant*, Berlin, Deutschland) genutzt. Die Anregung der PS erfolgte mit einem im Nanosekunden-Bereich gepulsten Laser bei einer Anregungswellenlänge von 440 nm.

Tabelle 17. Durchschnittliche Fluoreszenzlebenszeiten von *m*-THPC in *Jurkat*-Zellen zu verschiedenen Inkubationszeiten mit freiem *m*-THPC, *m*-THPC / **PII**, *m*-THPC / **Rho-PII**. Es wurden mindestens vier Zellen pro Probe vermessen und die Werte gemittelt.

Inkubationszeit	1 h	3 h	5 h	24 h
m-THPC	9.1 ns	8.7 ns	8.6 ns	5.9 ns
m-THPC + PII	9.1 ns	9.0 ns	8.8 ns	7.2 ns
m-THPC + Rho-PII	9.1 ns	8.8 ns	8.5 ns	6.8 ns

7. Appendix

7.1. Fluoreszenzmikroskopie

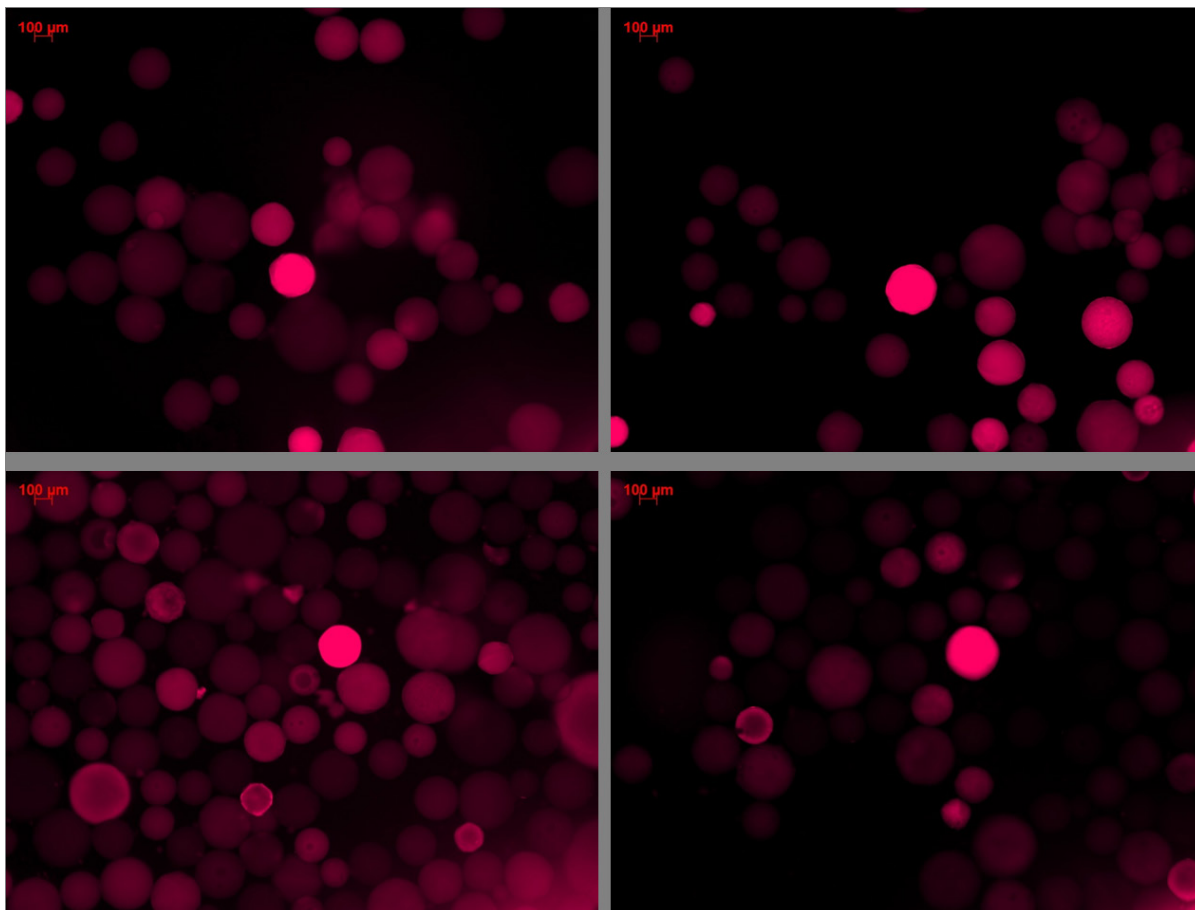


Abbildung 65. Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der festphasengebundenen Peptidbibliothek **Bib1** nach der Inkubation mit *m*-THPC. Beispiele für positive Treffer (Anreicherung von *m*-THPC an bestimmten Kügelchen) vor der Isolation und Abspaltung des Peptidmaterials vom festen Träger.

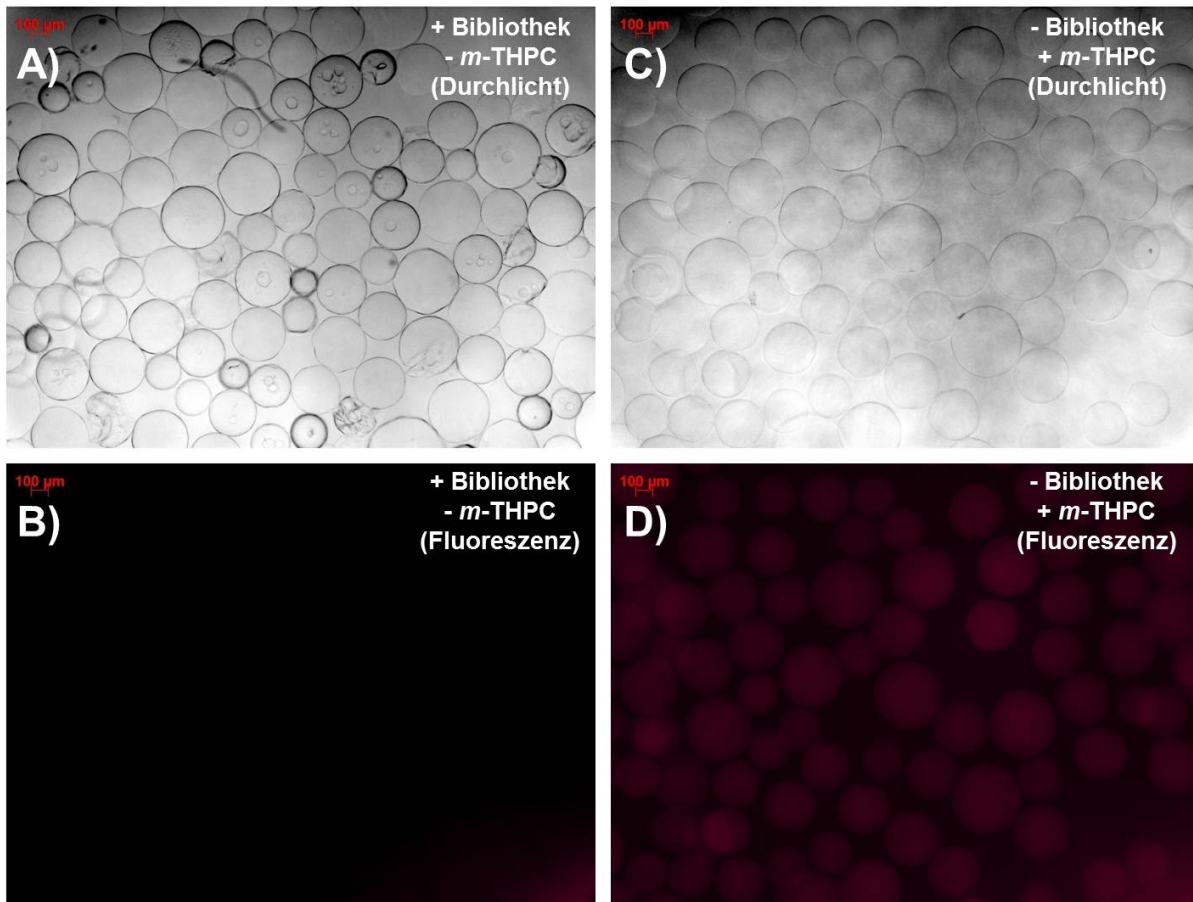


Abbildung 66. Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Kontrollexperimentes. Die festphasengebundene Peptidbibliothek **Bib1** im (A) Durchlicht- und (B) Fluoreszenz-Modus (ohne *m*-THPC). Das Aminomethyl-Chemmatrix-Harz (ohne Peptidbibliothek) nach Inkubation mit *m*-THPC im (C) Durchlicht- und (D) Fluoreszenz-Modus.

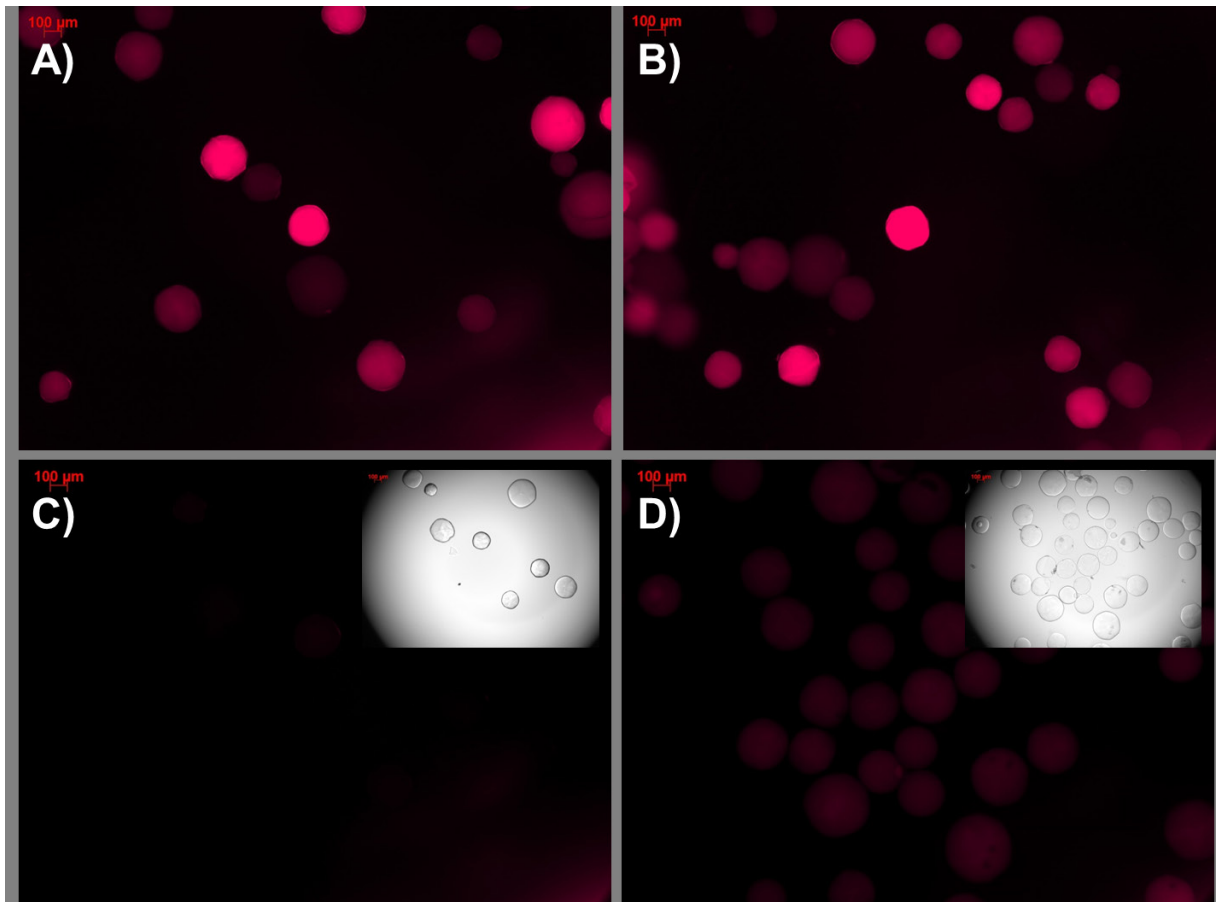


Abbildung 67. Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Peptidbibliothek **Bib2** inkubiert mit *m*-THPC (**A + B**), sowie der Kontrollexperimente: Die Peptidbibliothek **Bib2** (ohne *m*-THPC, **C**) und das Aminomethyl-Chemmatrix-Harz (ohne Peptidbibliothek) nach Inkubation mit *m*-THPC (**D**) (Ausschnitt: Durchlichtaufnahme des Bildausschnitts).

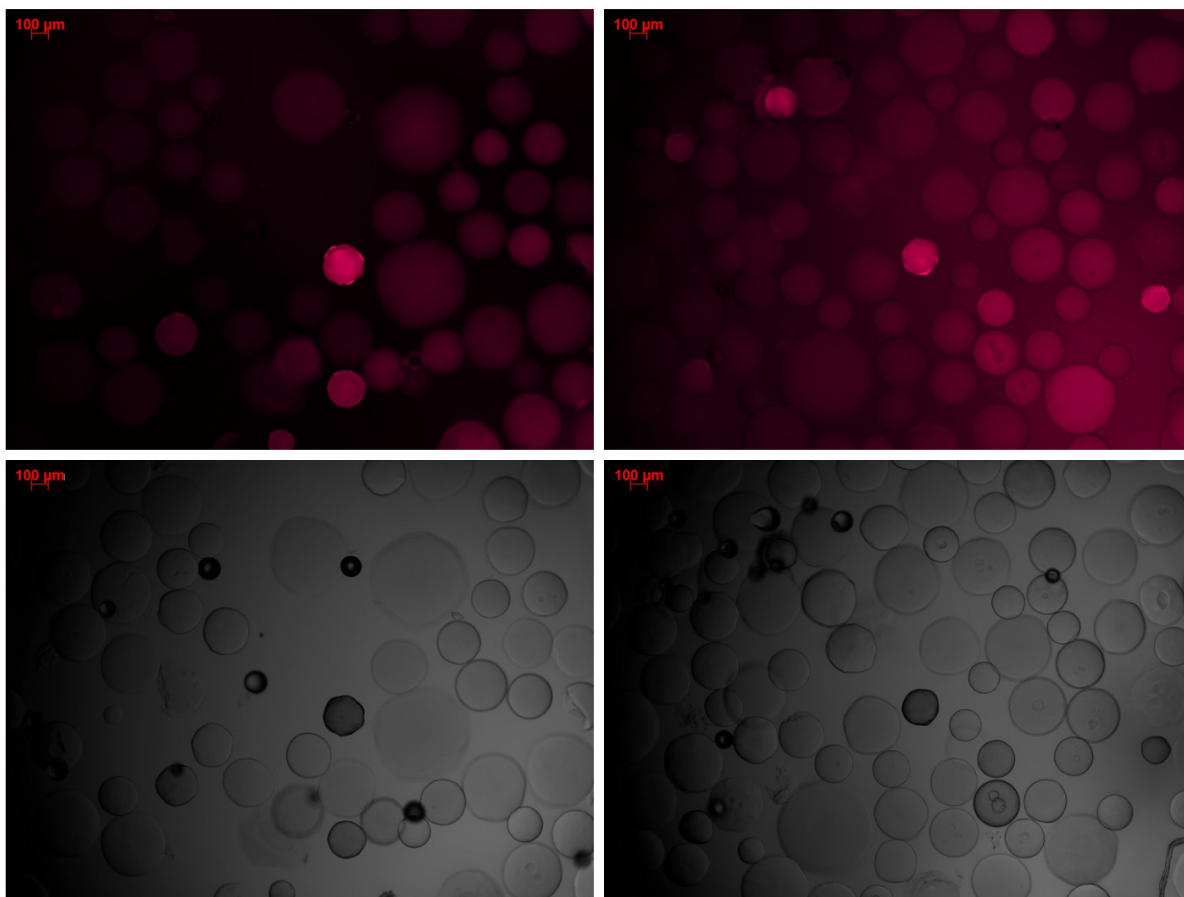


Abbildung 68. Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der festphasengebundenen Peptidbibliothek **Bib1** nach der Inkubation mit Chlorin E6 (Ce6) im Fluoreszenz- (oben) und im Streulicht-Modus (unten).

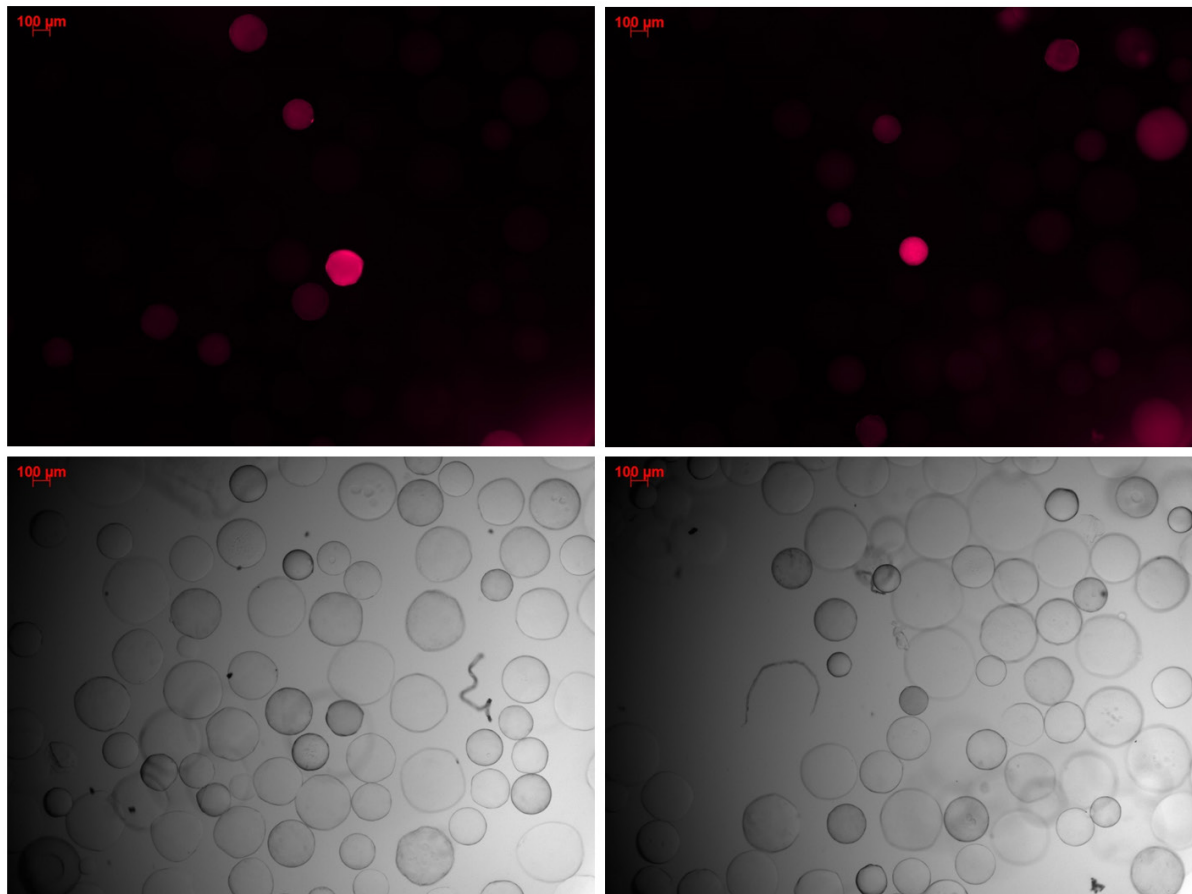


Abbildung 69. Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der festphasengebundenen Peptidbibliothek **Bib1** nach der Inkubation mit Pheophorbide A (Pba) im Fluoreszenz- (oben) und im Streulicht-Modus (unten).

7.2. Identifizierte Peptidsequenzen

Tabelle 18. Ergebnisse der MALDI-ToF-MS/MS-Sequenzierung des Peptidmaterials, abgespalten von einzelnen, fluoreszierenden Harzkügelchen aus der Peptidbibliothek **Bib1** nach Screening gegen *m*-THPC in 9:1 Wasser / Ethanol (Sequenzen, welche mit demselben Ion-Score bewertet wurden, sind in einer Zeile gelistet, Ion-Scores < 10 wurden vernachlässigt, Pos = Position in der Sequenz beginnend rechts vom *N*- zum C-Terminus des Peptids).

Probe	Pos1	Pos2	Pos3	Pos4	Pos5	Pos6	Pos7	Score
1	F	Q	E	L	F	G	F	82
2	F	F	L	F	F	S	F	77
3	F	F	Q	Q	F	Q	E	72
4	F	F	G	Q	E	F	F	57
5	S	L	K	L	Q	F	S	57
6	L	L	E	L	F	G	F	53
7	F	F	E	L	E	S	L	36
8	F	F	E	Q	F	Q	S	36
	F	E	F	Q	F	Q	S	36
9	S	F	F	E	F	S	L	34
10	F	F	E	S	F	Q	S	33
	F	E	F	S	F	Q	S	33
11	F	E	L	F	G	E	L	33
12	L	F	L	L	L	L	L	26
13	L	Q	Q	S	F	F	F	23
14	F	F	E	E	E	K	S	21
15	G	F	L	F	G	G	L	21
16	L	Q	K	Q	F	Q	S	20
17	F	E	G	L	G	F	L	19
18	K	F	E	L	L	Q	S	18
19	S	E	K	E	Q	F	L	18
20	Q	F	F	L	S	F	F	17
	Q	F	F	L	F	S	F	17
	Q	F	F	L	F	F	S	17
21	Q	Q	Q	Q	F	Q	K	17
22	K	L	G	F	Q	F	Q	16
23	L	L	L	F	Q	L	L	16
24	F	F	E	Q	F	F	S	14
25	G	L	L	E	F	F	F	13
26	Q	F	F	L	Q	K	F	11
27	Q	F	L	F	G	Q	L	9
28	F	S	F	F	S	G	Q	9
29	S	L	F	G	F	F	E	9
30	F	L	Q	K	F	F	E	9
31	F	F	L	F	G	G	S	8

32	S	K	L	E	S	Q	L	8
33	L	Q	Q	F	F	G	S	7
34	F	Q	F	S	S	Q	S	7
35	Q	G	F	G	Q	E	Q	7
36	S	F	G	F	F	F	E	7
37	L	F	L	F	F	E	Q	6
38	G	G	S	L	E	E	E	6
39	G	G	G	F	F	E	K	6
40	G	L	Q	F	L	L	Q	6
41	K	F	F	Q	F	S	Q	5

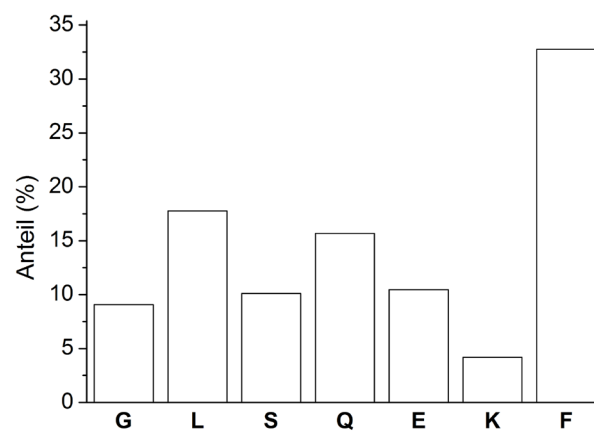


Abbildung 70. Prozentuale Häufigkeit, mit der jede der sieben Aminosäuren beim Screening der Peptidbibliothek **Bib1** gegen *m*-THPC in Wasser / Ethanol (9:1) gefunden wurde.

Tabelle 19. Ergebnisse der MALDI-ToF-MS/MS-Sequenzierung des Peptidmaterials, abgespalten von einzelnen, fluoreszierenden Harzkügelchen aus der Peptidbibliothek **Bib1** nach Screening gegen *m*-THPC in DMSO (Sequenzen, welche mit demselben Ion-Score bewertet wurden, sind in einer Zeile gelistet, Ion-Scores < 15 wurden vernachlässigt, Pos = Position in der Sequenz beginnend rechts vom *N*- zum *C*-Terminus des Peptids).

Probe	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Score
1	S	F	Q	F	E	F	L	88
2	F	Q	F	L	E	Q	E	80
3	Q	S	E	Q	F	E	E	68
4	S	S	L	E	F	Q	E	62
5	E	Q	Q	L	F	G	E	62
6	S	L	F	L	F	Q	S	51
7	Q	S	F	K	F	Q	E	50
8	S	F	G	L	F	F	F	48
9	F	S	F	L	S	F	S	46
10	Q	Q	Q	L	E	L	E	44
11	L	F	F	E	F	Q	K	42
12	S	S	Q	G	Q	G	E	41
13	E	E	E	F	F	S	E	37
14	Q	L	L	K	F	S	F	36
15	K	S	L	G	S	G	Q	34
16	S	S	F	F	F	F	F	30
17	E	E	F	F	E	G	L	30
18	Q	Q	Q	S	L	L	E	29
19	G	G	Q	L	L	S	Q	28
20	G	Q	Q	L	F	Q	K	26
21	S	Q	Q	F	L	G	E	20
22	S	L	E	E	Q	E	E	17
23	G	E	E	K	E	E	F	16
24	E	E	E	L	E	G	E	12
25	S	E	S	S	S	Q	S	11
26	F	G	S	S	S	E	S	9
27	S	Q	S	F	Q	E	F	7
28	E	E	E	E	E	E	E	7
29	G	G	G	S	K	K	K	6
30	G	G	S	L	E	E	E	6
31	G	G	G	S	F	K	K	6
32	G	G	S	E	E	E	E	6
33	G	G	S	E	E	E	E	6
34	G	G	L	L	F	F	F	6
35	G	G	G	G	S	L	F	6
36	G	G	G	S	F	K	K	6

37	G	G	G	G	G	E	E	6
38	G	G	G	G	Q	Q	K	6
39	G	G	G	G	S	L	F	6
40	G	F	F	F	K	F	F	6

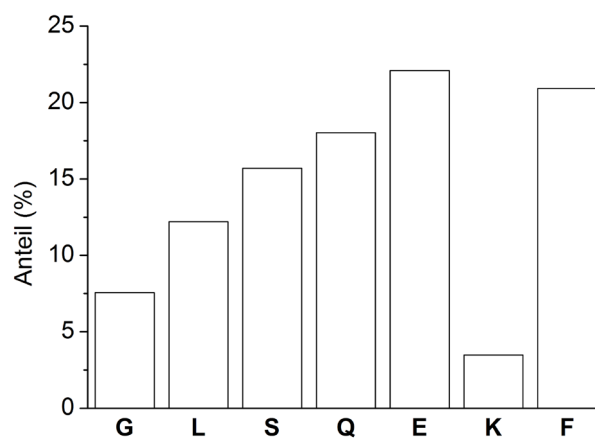


Abbildung 71. Prozentuale Häufigkeit, mit der jede der sieben Aminosäuren beim Screening der Peptidbibliothek **Bib1** gegen *m*-THPC in DMSO gefunden wurde.

Tabelle 20. Ergebnisse der MALDI-ToF-MS/MS-Sequenzierung des Peptidmaterials nach dem Screening von **Bib2** gegen *m*-THPC (Sequenzen, welche mit demselben Ion-Score bewertet wurden, sind in einer Zeile gelistet, Ion-Scores < 10 wurden vernachlässigt, Pos = Position in der Sequenz beginnend rechts vom *N*- zum *C*-Terminus des Peptids).

Probe	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	S/S	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Score
1	L	W	Q	Y	S/S	F	F	F	60
2	L F	F L	L L	Y Y	S/S	W W	F F	L L	57
3	W	Q	F	E	S/S	W	L	W	52
4	W	W	W	L	S/S	F	W	W	51
5	F	F	F	W	S/S	W	Q	W	49
6	F	F	F	W	S/S	W	Y	F	47
7	F	R	F	W	S/S	F	L	W	46
8	E Q	Q E	Y Y	F F	S/S	F F	F F	Q Q	46
9	E	W	F	F	S/S	Y	F	L	46
10	F F	Q Q	F F	F F	S/S	W E	E W	F F	43
11	R	E	F	F	S/S	Y	F	Y	39
12	Y	F	F	Q	S/S	Y	F	W	38
13	L F	F L	W W	R R	S/S	Y Y	W W	Y Y	37
14	W	L	F	F	S/S	F	W	Y	34
15	W Q	Q W	F F	Y Y	S/S	W W	Y Y	Y Y	33
16	F	F	Y	Q	S/S	Q	W	F	31
17	F W	W F	W W	F F	S/S	F F	W W	W W	30
18	F F W W	W W F F	L L L L	W W W W	S/S	Y Y Y Y	F W F W	W F W F	23
19	F F	F F	F F	Q Q	S/S	Q Q	Y Q	Q Y	22
20	R	F	L	Y	S/S	F	W	L	21
21	L W	W L	Q Q	Y Y	S/S	F F	F F	F F	17
22	E	Y	Q	W	S/S	F	F	F	15
23	F F	Q Q	Q Q	L L	S/S	L L	E Q	Q E	12
24	Y	F	F	Y	S/S	F	L	W	12
25	W W	R R	W W	L L	S/S	W E	E W	E E	12
26	E E	E E	L L	R R	S/S	F F	F W	W F	11
27	E	W	F	F	S/S	L	F	L	10

28	E E	L L	R R	R R	S/S	W W	Y R	R Y	10
----	--------	--------	--------	--------	-----	--------	--------	--------	----

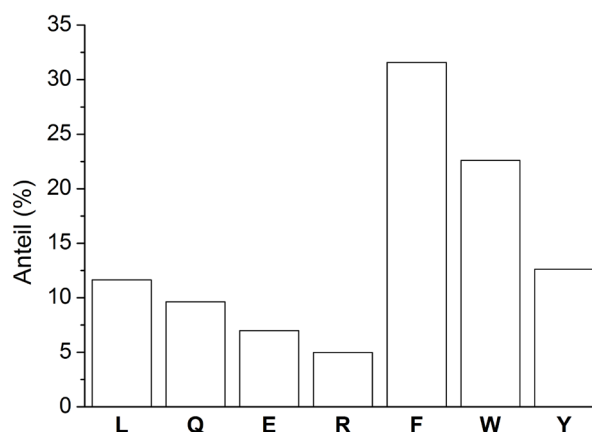


Abbildung 72. Prozentuale Häufigkeit, mit der jede der sieben Aminosäuren beim Screening der Peptidbibliothek **Bib2** gegen *m*-THPC gefunden wurde.

Tabelle 21. Ergebnisse der MALDI-Tof-MS/MS-Sequenzierung des Peptidmaterials nach dem Screening von **Bib1** gegen Chlorin E6 (Sequenzen, welche mit demselben Ion-Score bewertet wurden, sind in einer Zeile gelistet, Ion-Scores < 10 wurden vernachlässigt, Pos = Position in der Sequenz beginnend rechts vom *N*- zum *C*-Terminus des Peptids).

Probe	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Score
1	Q	F	Q	Q	S	F	F	71
2	F	F	F	G	Q	Q	S	69
3	Q	L	L	L	Q	L	F	58
4	S	G	G	L	Q	Q	S	52
5	E	L	Q	G	E	G	S	49
6	L	L	Q	G	Q	Q	Q	48
7	Q	F	F	L	L	F	G	47
8	Q	L	F	F	L	F	G	40
9	Q	K	L	E	F	F	F	38
10	S	Q	Q	Q	F	F	F	38
11	K	S	L	F	Q	F	F	41
12	Q	Q	G	F	F	L	L	40
13	Q	Q	F	G	F	L	L	39
14	S	L	K	E	E	E	F	37
15	L	S	K	E	E	E	F	37
16	Q	Q	F	G	F	F	S	37

17	S	F	F	F	L	G	S	34
18	S	F	F	F	L	S	G	34
19	F	S	F	F	L	G	S	33
20	S	L	F	F	G	L	Q	32
21	S	L	F	F	G	Q	L	32
22	L	S	F	F	G	L	Q	29
23	L	L	Q	E	E	S	S	28
24	F	F	F	S	L	L	L	27
25	Q	Q	S	S	F	F	S	26
26	G	F	L	L	F	F	S	25
27	F	G	L	L	F	F	S	24
28	L	F	Q	Q	F	L	G	24
29	F	L	Q	Q	F	L	G	23
30	E	E	E	K	L	L	S	22
31	E	E	K	E	L	L	S	21
32	E	K	E	E	L	L	S	20
33	K	E	E	E	L	L	S	20
34	F	Q	Q	S	Q	F	S	19
35	F	Q	Q	Q	S	F	S	19
36	Q	F	Q	S	Q	F	S	16
37	L	E	E	L	K	E	F	16
38	L	E	E	K	L	E	F	13

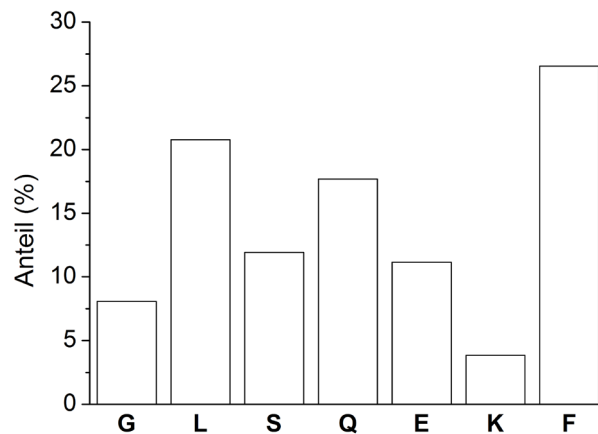


Abbildung 73. Prozentuale Häufigkeit, mit der jede der sieben Aminosäuren beim Screening der Peptidbibliothek **Bib1** gegen Chlorin E6 gefunden wurde.

Tabelle 22. Ergebnisse der MALDI-Tof-MS/MS-Sequenzierung des Peptidmaterials nach dem Screening von **Bib1** gegen Pheophorbid A (Sequenzen, welche mit demselben Ion-Score bewertet wurden, sind in einer Zeile gelistet, Ion-Scores < 10 wurden vernachlässigt, Pos = Position in der Sequenz beginnend rechts vom N- zum C-Terminus des Peptids).

Probe	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Score
1	F	Q	L	F	Q	L	Q	74
	Q	F	L	F	Q	L	Q	70
2	F	F	F	S	S	Q	F	69
3	Q	F	F	L	G	E	E	65
	S	F	Q	F	F	F	Q	61
4	Q	Q	F	S	F	S	L	65
5	S	F	F	F	Q	F	E	56
	S	F	F	K	F	F	E	
6	F	L	F	K	E	K	S	53
	F	L	F	K	K	E	S	
7	F	S	F	E	K	E	L	50
8	L	F	F	Q	Q	G	L	49
9	K	G	L	F	E	G	E	48
	K	G	L	F	E	E	G	
10	F	F	K	S	G	E	K	44
11	L	L	L	F	L	Q	K	44
12	Q	Q	S	E	L	F	F	42
13	L	L	F	S	F	Q	E	40
14	Q	Q	L	G	F	F	G	40
15	E	F	F	Q	L	S	S	39
	K	Q	F	Q	L	S	L	38
16	S	L	L	Q	L	F	F	37
17	Q	Q	Q	S	Q	S	S	36
	F	L	G	L	Q	Q	S	34
18	G	G	F	L	S	G	F	36
19	S	E	E	E	L	F	S	32
	L	F	F	L	S	G	S	30
20	E	L	E	Q	F	E	S	31
	E	L	E	Q	S	K	K	30
21	Q	E	L	F	S	F	F	31
22	S	Q	L	F	S	Q	K	31
23	F	F	G	F	S	L	S	32
24	F	F	S	F	L	L	S	31
25	G	E	Q	Q	Q	Q	F	31
26	S	K	E	G	E	F	E	30
27	S	S	E	E	E	F	E	30
28	L	F	F	S	F	L	S	28
	F	L	F	S	F	L	S	
29	F	Q	G	F	L	Q	Q	28
30	S	E	K	G	Q	E	F	26
31	F	Q	Q	K	L	F	G	26

32	F	F	Q	Q	G	F	F	25
33	S	G	G	S	F	F	L	23
34	G	G	G	G	L	L	K	22
35	S	E	F	Q	E	S	Q	21
36	E	E	G	E	F	Q	G	21
37	L	Q	L	L	L	L	E	12

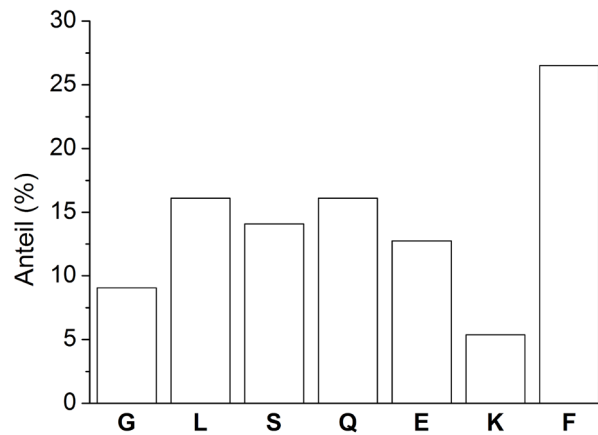
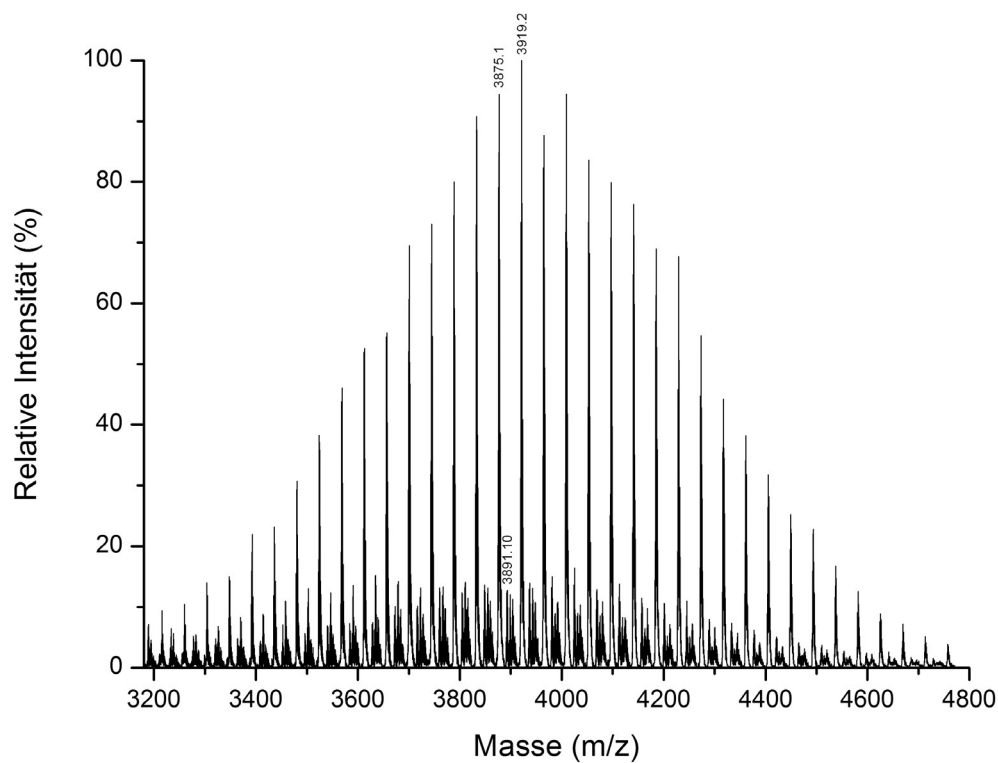
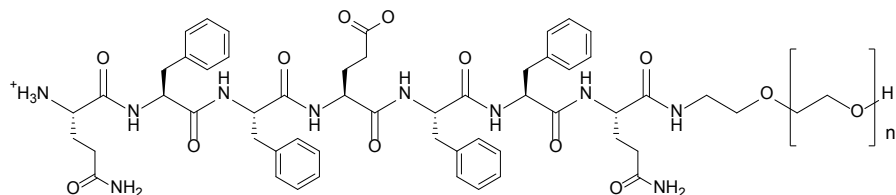


Abbildung 74. Prozentuale Häufigkeit, mit der jede der sieben Aminosäuren beim Screening der Peptidbibliothek **Bib1** gegen Pheophorbide A gefunden wurde.

PI (H₂N-QFFEFFQ-PEO₃₂₀₀):



MALDI-TOF-MS-Analyse von **PI**:

$$M_{\text{berechnet}}[M+Na]^+ = 3919.4 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+K]^+ = 3890.5 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 44.0$ g/mol (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO}(66)} + M_{\text{Na}} = 3919.4$ g/mol. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von ± 0.2 g/mol bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.23 – 6.94 (m, 20H, CH^{Ar} Phe), 4.86 – 4.59 (m, 7H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.00 – 3.54 (m, 308H, PEO), 3.19 – 2.46 (m, 18H, CH_2 Phe, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Gln, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Glu), 2.12 – 1.88 (m, 4H, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Glu).

Das Verhältnis zwischen Peptid und Ethylenoxid wurde durch den Vergleich der Integrale der 20 H von CH^{Ar} Phe bei 7.23 – 6.94 ppm und 308 H von PEO bei 4.00 – 3.54 ppm berechnet. Es entspricht einem Verhältnis von 1 : 77.

FT-IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$): 3272 (vw), 2885 (m), 1659 (w), 1636 (w), 1540 (w), 1466 (w), 1407 (vw), 1343 (m), 1281 (m), 1240 (w), 1146 (m), 1109 (vs, PEO), 1064 (m), 960 (m), 843 (m), 748 (vw), 688 (vw).

PII (H_2N -QFFLFFQ- PEO_{3200}):

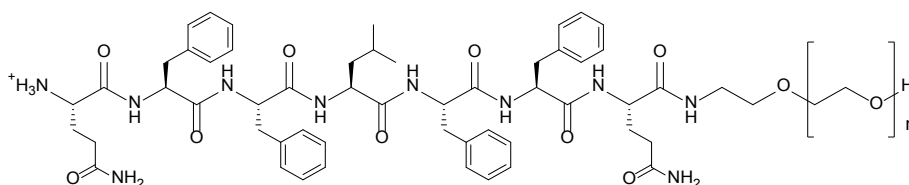


Abbildung 77. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **PII**.

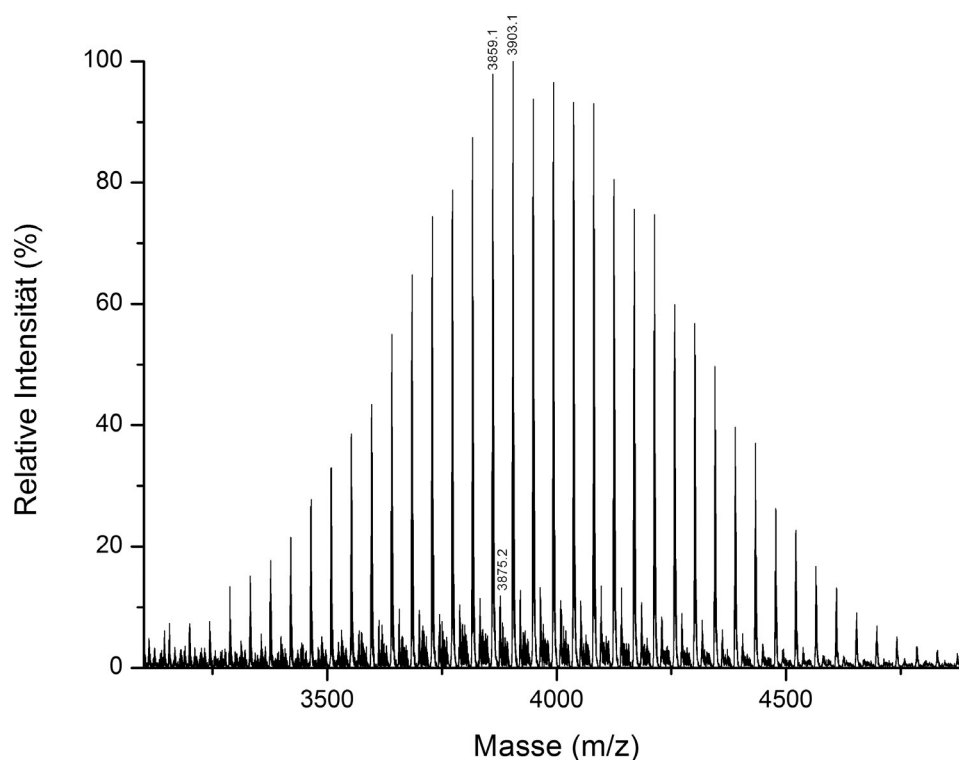


Abbildung 78. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **PII**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **PII**:

$$M_{\text{peak}}[M+\text{Na}]^+ = m/z \ 3903.1 \qquad M_{\text{berechnet}}[M+\text{Na}]^+ = 3903.4 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[M+\text{K}]^+ = m/z \ 3875.1 \qquad M_{\text{berechnet}}[M+\text{K}]^+ = 3875.5 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 44.0 \text{ g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO}(66)} + M_{\text{Na}} = 3903.4 \text{ g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 0.3 \text{ g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.29-6.88 (m, 20H, CH^{Ar} Phe), 4.65-4.38 (m, 7H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.03-3.50 (m, 288H, PEO), 3.10-2.50 (m, 16H, CH_2 Phe, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Gln), 1.55-1.40 (m, 3H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Leu, $\text{C}^{\gamma}\text{H}$ Leu), 0.95-0.84 (m, 6H, CH_3 Leu).

Das Verhältnis zwischen Peptid und Ethylenoxid wurde durch den Vergleich der Integrale der 20 H von CH^{Ar} Phe bei 7.29-6.88 ppm und 288 H von PEO bei 4.03-3.50 ppm berechnet. Es entspricht einem Verhältnis von 1 : 72.

FT-IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$): 3274 (m), 2886 (s), 1667 (m), 1633 (s), 1549 (m), 1466 (m), 1407 (vw), 1344 (m), 1280 (s), 1240 (m), 1201 (w), 1145 (s), 1112 (vs, PEO), 1065 (m), 960 (m), 843 (m), 744 (vw), 698 (vw).

PIII (H₂N-FFEQFQS-PEO₃₂₀₀):

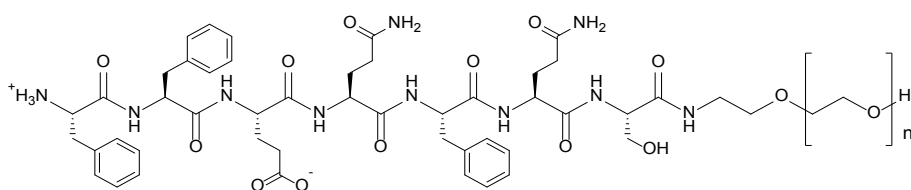


Abbildung 79. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **PIII**.

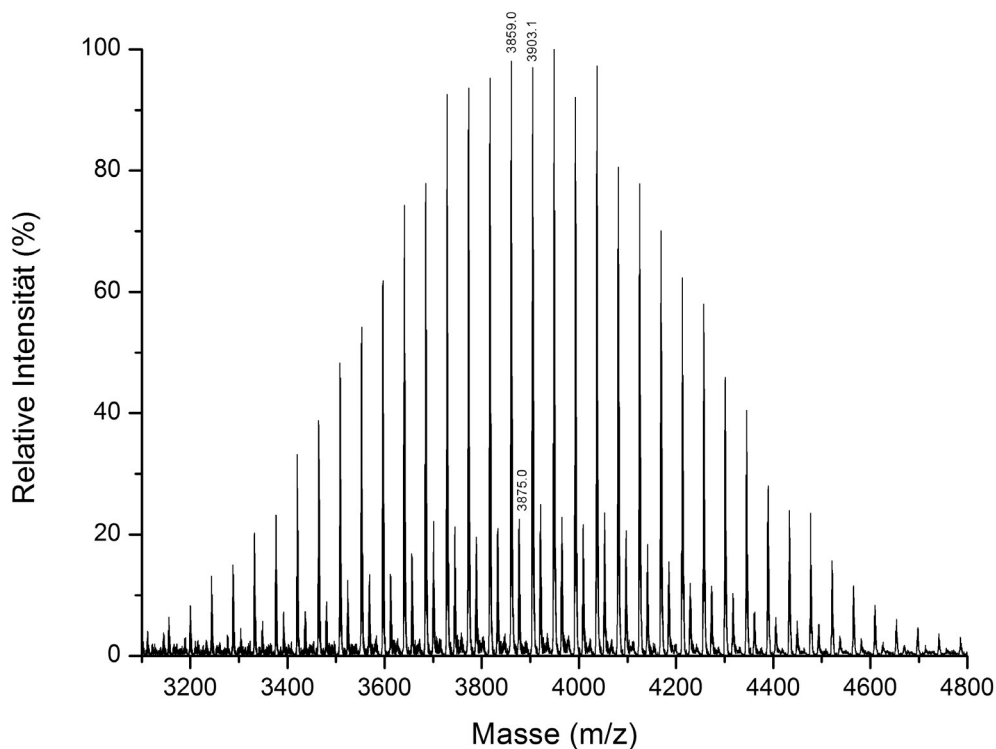


Abbildung 80. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **PIII**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **PIII**:

$$M_{\text{peak}}[M+\text{Na}]^+ = m/z \ 3859.0 \quad M_{\text{berechnet}}[M+\text{Na}]^+ = 3859.4 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[M+\text{K}]^+ = m/z \ 3875.0 \quad M_{\text{berechnet}}[M+\text{K}]^+ = 3875.5 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 44.0 \text{ g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO}(66)} + M_{\text{Na}} = 3859.4 \text{ g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 0.4 \text{ g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.33 – 7.00 (m, 15H, CH^{Ar} Phe), 4.80 – 4.53 (m, 7H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.04 – 3.55 (m, 276H, PEO), 3.33 – 2.98 (m, 6H, CH_2 Phe), 2.59 – 2.48 (m, 4H, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Glu) 2.24 – 1.93 (m, 8H, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Gln).

Das Verhältnis zwischen Peptid und Ethylenoxid wurde durch den Vergleich der Integrale der 15 H von CH^{Ar} Phe bei 7.33 – 7.00 ppm und 276 H von PEO bei 4.04 – 3.55 ppm berechnet. Es entspricht einem Verhältnis von 1 : 69.

FT-IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$): 3285 (w), 2879 (m), 1696 (m), 1632 (s), 1519 (m), 1467 (m), 1412 (vw), 1359 (m), 1342 (m), 1280 (s), 1241 (m), 1200 (w), 1145 (s), 1098 (vs, PEO), 1060 (m), 961 (m), 842 (m), 745 (vw), 696 (vw).

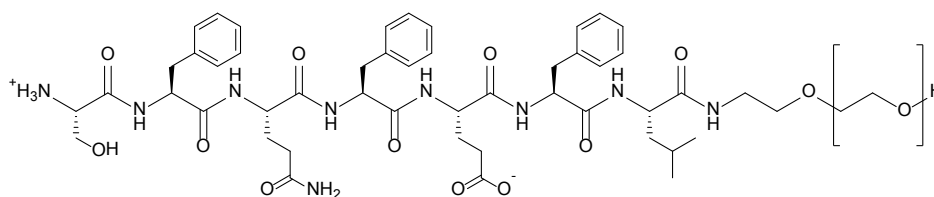
PI_{DMSO} ($\text{H}_2\text{N-SFQFEFL-PEO}_{3200}$):

Abbildung 81. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **PI_{DMSO}**.

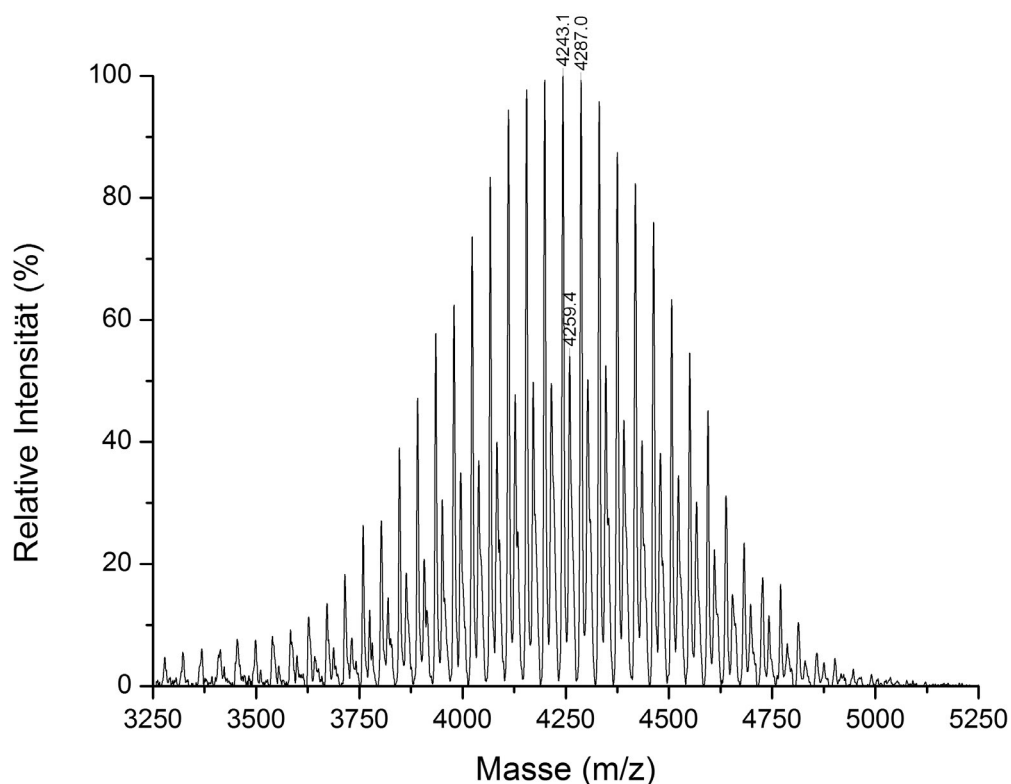


Abbildung 82. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **PI_{DMSO}**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **PI_{DMSO}**:

$$M_{\text{peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \, 4243.1 \qquad M_{\text{berechnet}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4242.8 \, \text{g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \, 4259.4 \qquad M_{\text{berechnet}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4258.8 \, \text{g/mol}$$

$\Delta m = 43.9 \, \text{g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO}(73)} + M_{\text{H}} = 4242.8 \, \text{g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 0.3 \, \text{g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.39 – 6.98 (m, 15H, CH^{Ar} Phe), 4.87 – 4.55 (m, 7H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.36 – 4.23 (m, 2H, CH_2 Ser), 4.19 – 3.43 (m, 312H, PEO), 3.13 – 2.90 (m, 6H, CH_2 Phe), 2.58 – 2.38 (m, 4H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Gln), 2.24 – 1.77 (m, 4H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Gln), 1.56 – 1.47 (m, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Leu), 1.34 – 1.19 (m, 1H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}$ Leu), 0.89 (dd, 6H, $J = 24 \, \text{Hz}$, $6 \, \text{Hz}$, $\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu).

Das Verhältnis zwischen Peptid und Ethylenoxid wurde durch den Vergleich der Integrale der 15 H von CH^{Ar} Phe bei 7.39 – 6.98 ppm und 312 H von PEO bei 4.19 – 3.43 ppm berechnet. Es entspricht einem Verhältnis von 1 : 78.

FT-IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$): 3278 (s), 3068 (w), 2884 (s), 2742 (w), 1632 (s), 1547 (m), 1465 (m), 1406 (w), 1343 (m), 1280 (m), 1240 (m), 1145 (m), 1099 (s), 958 (m), 842 (m), 746 (w), 696 (w), 615 (w), 561 (w), 520 (w), 474 (vw).

PII_{DMSO} (H₂N-QSEQFEE-PEO₃₂₀₀):

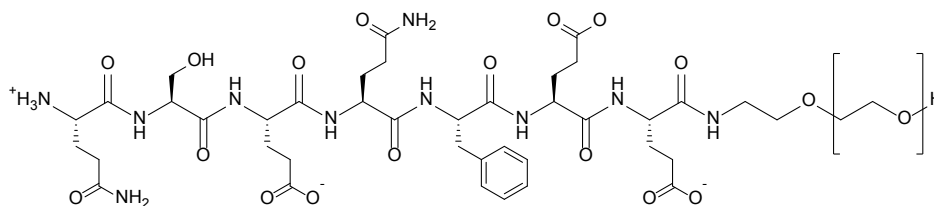


Abbildung 83. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **PII_{DMSO}**.

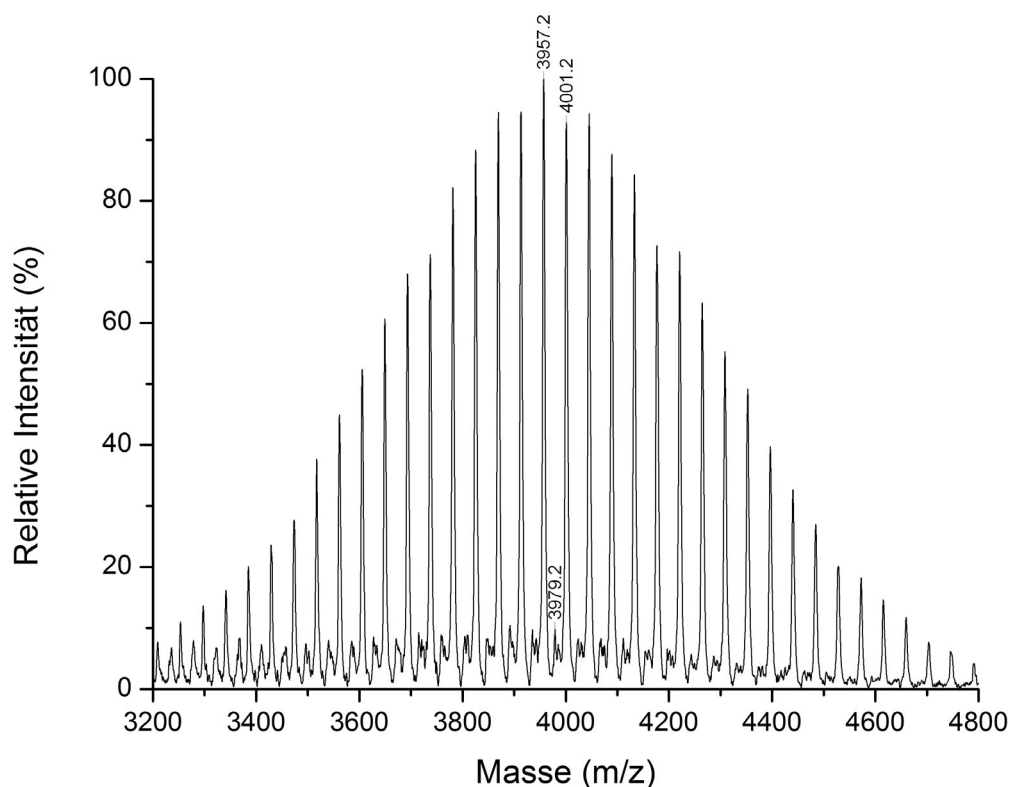


Abbildung 84. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **PII_{DMSO}**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **PII_{DMSO}**:

$$M_{\text{peak}}[M+H]^+ = m/z \ 3957.2$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+H]^+ = 3957.4 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[M+Na]^+ = m/z \ 3979.2$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+Na]^+ = 3979.4 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 43.9 \text{ g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO}(67)} + M_{\text{H}} = 3957.4 \text{ g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 0.2 \text{ g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.27 – 7.10 (m, 5H, CH^{Ar} Phe), 4.92 – 4.63 (m, 7H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.28 – 3.55 (m, 312H, PEO), 4.61 – 4.57 (m, 2H, CH_2 Ser), 3.14 – 3.02 (m, 2H, CH_2 Phe), 2.87 – 2.80 (m, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Gln₁), 2.66 – 2.07 (m, 8H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Gln₄, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Glu), 2.44 – 1.95 (m, 10H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Gln, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Glu).

Das Verhältnis zwischen Peptid und Ethylenoxid wurde durch den Vergleich der Integrale der 5 H von CH^{Ar} Phe bei 7.27 – 7.10 ppm und 312 H von PEO bei 4.28 – 3.55 ppm berechnet. Es entspricht einem Verhältnis von 1 : 78.

FT-IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$): 3277 (s), 3080 (w), 2883 (s), 2742 (w), 2698 (w), 1631 (s), 1548 (m), 1465 (m), 1408 (w), 1360 (w), 1342 (m), 1280 (m), 1238 (m), 1145 (m), 1099 (s), 1064 (m), 958 (m), 842 (m), 746 (w), 699 (w), 645 (w), 590 (vw), 519 (w), 474 (w).

PII₈₅₀ (H₂N-QFFLFFQ-PEO₈₅₀):

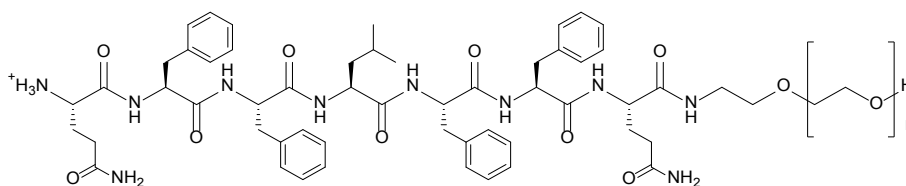


Abbildung 85. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **PII₈₅₀**.

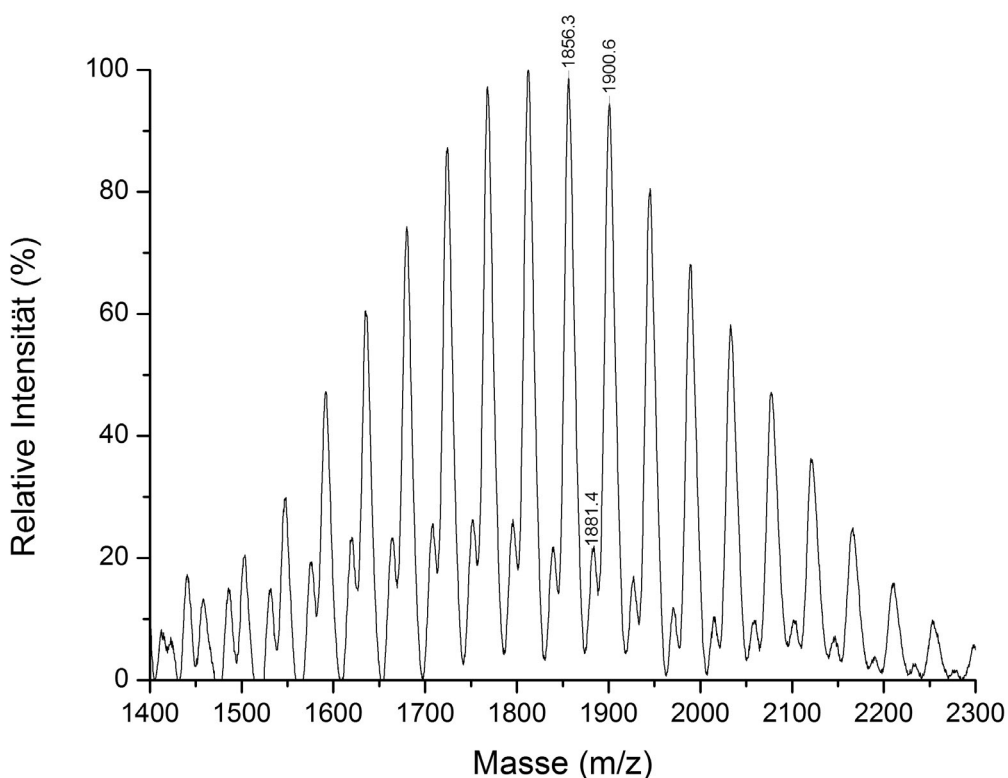


Abbildung 86. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **PII₈₅₀**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **PII₈₅₀**:

$$M_{\text{peak}}[M+H]^+ = m/z \ 1856.3$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+H]^+ = 1857.2 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[M+Na]^+ = m/z \ 1881.4$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+Na]^+ = 1879.2 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 44.1 \text{ g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO}(18)} + M_{\text{H}} = 1857.2 \text{ g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 0.9 \text{ g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.27-6.89 (m, 20H, CH^{Ar} Phe), 4.87-4.51 (m, 7H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.01-3.47 (m, 80H, PEO), 3.15-2.05 (m, 16H, CH_2 Phe, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Gln), 1.56-1.37 (m, 3H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Leu, $\text{C}^{\gamma}\text{H}$ Leu), 0.96-0.82 (m, 6H, CH_3 Leu).

Das Verhältnis zwischen Peptid und Ethylenoxid wurde durch den Vergleich der Integrale der 20 H von CH^{Ar} Phe bei 7.27-6.89 ppm und 80 H von PEO bei 4.01-3.47 ppm berechnet. Es entspricht einem Verhältnis von 1 : 20.

FT-IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$): 3270 (s), 3086 (w), 3031 (vw), 2871 (s), 1781 (vw), 1691 (s), 1672 (s), 1627 (s), 1541 (s), 1450 (m), 1409 (w), 1351 (m), 1286 (w), 1250 (m), 1198 (m), 1098 (s), 948 (m), 834 (w), 799 (w), 747 (w), 697 (m), 504 (w), 492 (w).

PII₅₂₀₀ ($\text{H}_2\text{N-QFFLFFQ-PEO}_{5200}$):

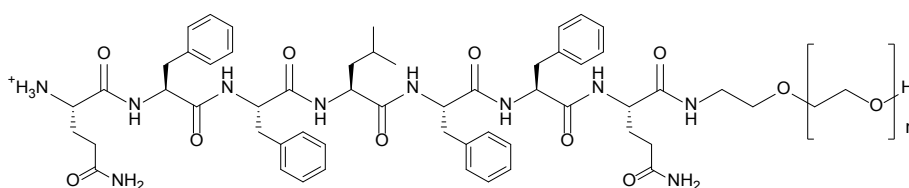


Abbildung 87. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **PII₅₂₀₀**.

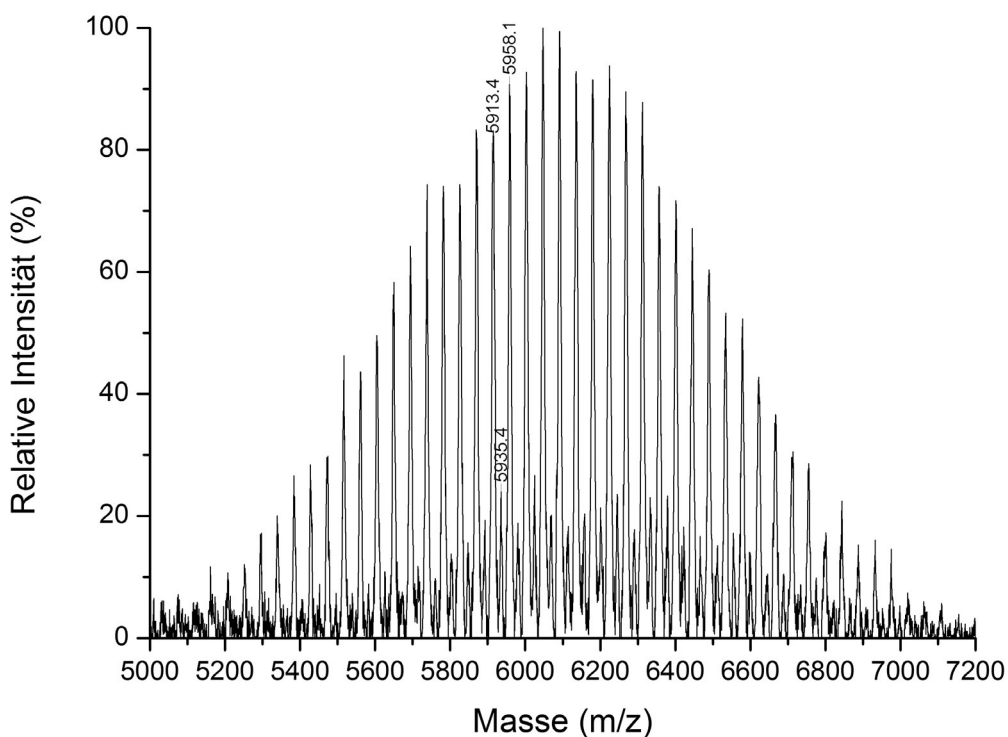


Abbildung 88. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **PII₅₂₀₀**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **PII₅₂₀₀**:

$$M_{\text{peak}}[M+H]^+ = m/z \ 5913.4$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+H]^+ = 5912.0 \text{ Da}$$

$$M_{\text{peak}}[M+Na]^+ = m/z \ 5935.4$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+H]^+ = 5934.0 \text{ Da}$$

$\Delta m = 44.7 \text{ g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO(110)}} + M_{\text{H}} = 5912.0 \text{ g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 1.4 \text{ g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.27-6.89 (m, 20H, CH^{Ar} Phe), 4.75-4.40 (m, 7H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.04-3.70 (m, 596H, PEO), 3.10-1.97 (m, 16H, CH_2 Phe, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Gln), 1.54-1.39 (m, 3H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Leu, $\text{C}^{\gamma}\text{H}$ Leu), 0.95-0.78 (m, 6H, CH_3 Leu).

Das Verhältnis zwischen Peptid und Ethylenoxid wurde durch den Vergleich der Integrale der 20 H von CH^{Ar} Phe bei 7.27-6.89 ppm und 596 H von PEO bei 4.04-3.70 ppm berechnet. Es entspricht einem Verhältnis von 1 : 124.

FT-IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$): 3274 (w), 2882 (s), 1668 (w) 1631 (m), 1544 (w), 1466 (m), 1343 (m), 1280 (m), 1240 (m), 1145 (m), 1104 (s), 1063 (m), 959 (m), 842 (m), 747 (vw), 698 (vw), 528 (vw).

PII-ahx-PII (H₂N-QFFLFFQ-ahx-QFFLFFQ-PEO₅₂₀₀):

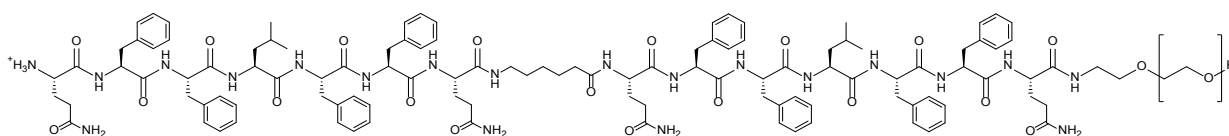


Abbildung 89. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **PII-ahx-PII**.

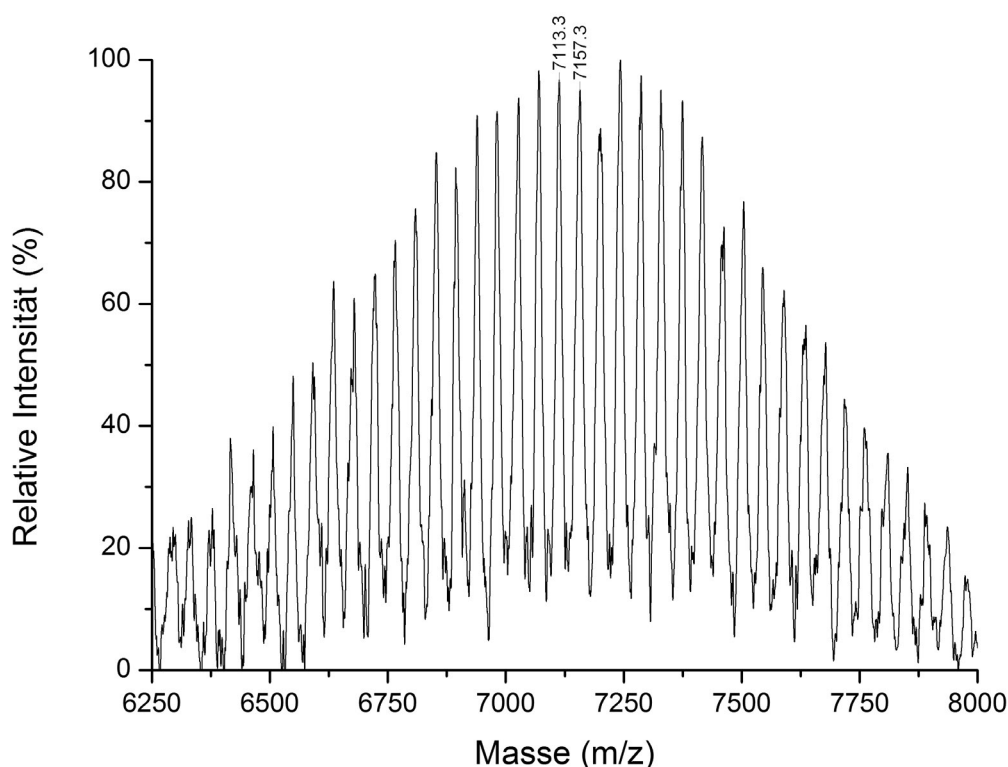


Abbildung 90. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **PII-ahx-PII**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **PII-ahx-PII**:

$$M_{\text{peak}}[M+H]^+ = m/z \ 7113.3$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+H]^+ = 7113.2 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[M+H]^+ = m/z \ 7157.3$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+H]^+ = 7157.2 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 44.2 \text{ g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO}(112)} + M_{\text{H}} = 7113.2 \text{ g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 0.1 \text{ g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.32 – 6.91 (m, 40H, CH^{Ar} Phe), 4.92 – 4.53 (m, 15H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.06 – 3.71 (m, 552H, PEO), 3.14-2.05 (m, 32H, CH_2 Phe, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Gln), 1.76-1.37 (m, 11H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Leu, $\text{C}^{\gamma}\text{H}$ Leu, $\text{C}^{\alpha-\delta}\text{H}_2$ Ahx), 0.98 – 0.86 (m, 12H, CH_3 Leu).

Das Verhältnis zwischen Peptid und Ethylenoxid wurde durch den Vergleich der Integrale der 40 H von CH^{Ar} Phe bei 7.32 – 6.91 ppm und 552 H von PEO bei 4.06 – 3.71 ppm berechnet. Es entspricht einem Verhältnis von 1 : 138.

FT-IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$): 3274 (m), 3084 (vw), 2883 (s), 1691 (w). 1658 (m), 1627 (s), 1540 (m), 1465 (m), 1343 (m), 1280 (m), 1240 (m), 1145 (m), 1101 (s), 959 (m), 842 (m), 744 (vw), 697 (w), 573 (vw).

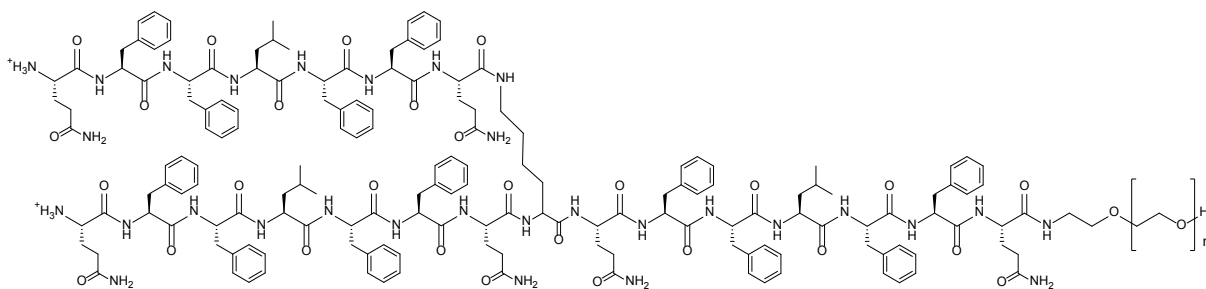
PII₂-K-PII ((H₂N-QFFLFFQ)₂-K-QFFLFFQ-PEO₅₂₀₀):

Abbildung 91. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **PII₂-K-PII**.

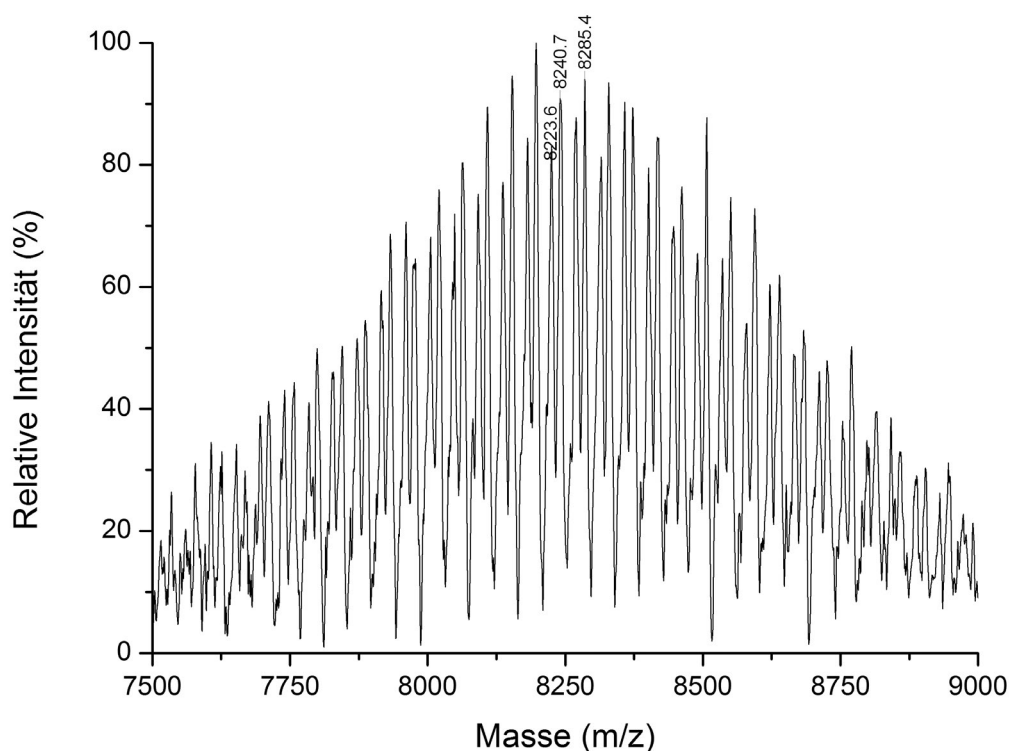


Abbildung 92. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **PII₂-K-PII**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **PII₂-K-PII**:

$$M_{\text{peak}}[M+H]^+ = m/z \ 8240.7$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+H]^+ = 8241.4 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[M+Na]^+ = m/z \ 8223.6$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+Na]^+ = 8219.4 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 44.7 \text{ g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO}(112)} + M_{\text{Na}} = 8241.4 \text{ g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 0.7 \text{ g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.31-6.91 (m, 60H, CH^{Ar} Phe), 5.00-4.42 (m, 22H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.05-3.70 (m, 544H, PEO), 3.13-2.03 (m, 50H, CH_2 Phe, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Gln, $\text{C}^{\omega}\text{H}_2$ Lys), 2.03-1.19 (m, 15H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Leu, $\text{C}^{\gamma}\text{H}$ Leu, $\text{C}^{\beta+\gamma+\delta}\text{H}_2$ Lys), 0.99-0.82 (m, 18H, CH_3 Leu).

Das Verhältnis zwischen Peptid und Ethylenoxid wurde durch den Vergleich der Integrale der 60 H von CH^{Ar} Phe bei 7.31 – 6.91 ppm und 544 H von PEO bei 4.05 – 3.70 ppm berechnet. Es entspricht einem Verhältnis von 1 : 136.

FT-IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$): 3277 (m), 2883 (s), 1629 (s), 1543 (m), 1464 (m), 1408 (w), 1343 (m), 1280 (m), 1241 (m), 1145 (m), 1100 (s), 959 (m), 843 (m), 745 (w), 698 (m), 573 (vw), 504 (vw).

Pal-PII (Pal-GGQFFLFFQ-PEO₃₂₀₀):

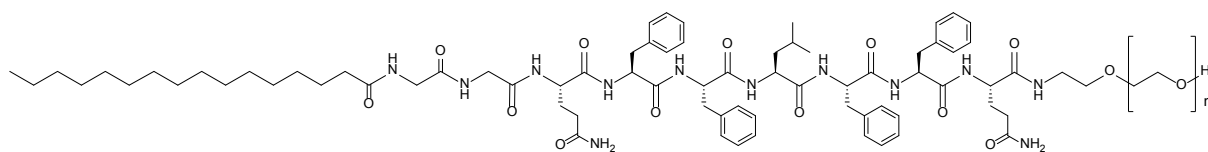


Abbildung 93. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **Pal-PII**.

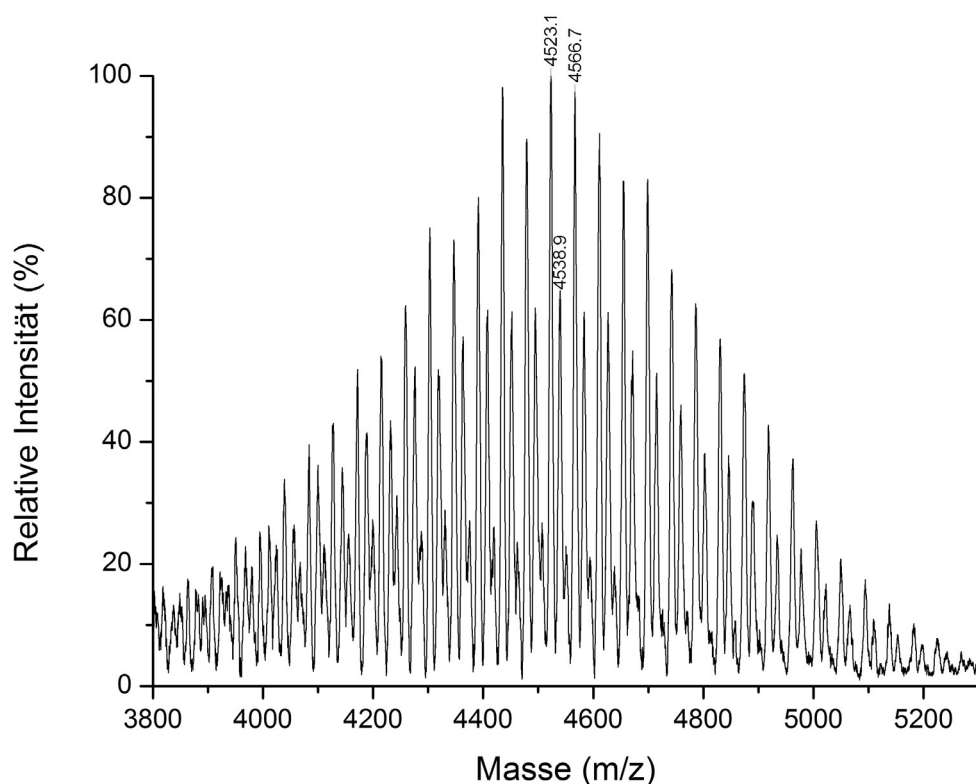


Abbildung 94. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **Pal-P11**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **Pal-P11**:

$$M_{\text{peak}}[M+\text{Na}]^+ = m/z \ 4523.1$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+\text{Na}]^+ = 4522.3 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[M+\text{K}]^+ = m/z \ 4538.9$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+\text{K}]^+ = 4538.3 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 43.7 \text{ g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO}(70)} + M_{\text{Na}} = 4522.3 \text{ g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 0.8 \text{ g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.43 – 7.18 (m, 20H, CH^{Ar} Phe), 5.03 – 4.84 (m, 7H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.17 – 3.83 (m, 240H, PEO), 3.74 – 3.62 (m, 4H, CH_2 Gly), 3.25 – 2.99 (m, 8H, CH_2 Phe), 2.77 – 2.65 (m, 8H, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Gln), 2.19 – 2.12 (m, 2H, CH_2 Pal), 1.70 – 1.60 (m, 3H, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1.45 – 1.31 (m, 26H, CH_2 Pal), 1.08 – 1.00 (m, 6H, CH_3 Leu), 0.83 (s, 3H, CH_3 Pal).

MALDI-TOF-MS-Analyse von **Pal-PEO**:

$$M_{\text{peak}}[M+\text{Na}]^+ = m/z \ 3273.4$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+\text{Na}]^+ = 3273.8 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[M+\text{K}]^+ = m/z \ 3289.8$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+\text{K}]^+ = 3289.8 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 44.1 \text{ g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Pal}} + M_{\text{PEO(66)}} + M_{\text{Na}} = 3273.8 \text{ g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 0.4 \text{ g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 4.12 – 3.57 (m, 292H, PEO), 2.69 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 1.73 (q, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 1.42 – 1.15 (m, 24H, CH_2), 0.80 (t, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 3H, CH_3). Das Verhältnis zwischen Palmitinsäure und Ethylenoxid wurde durch den Vergleich der Integrale der 3 H von CH_3 bei 0.80 ppm und 292 H von PEO bei 4.12 – 3.57 ppm berechnet. Es entspricht einem Verhältnis von 1 : 73.

FT-IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$): 2881 (s), 1654 (m), 1548 (m), 1467 (m), 1360 (w), 1342 (m), 1280 (m), 1240 (w), 1146 (m), 1096 (s), 1062 (m), 958 (m), 841 (m), 583 (m), 518 (w), 468 (w).

PI-ds ($\text{H}_2\text{N-LWQY-CDS-FFF-PEO}_{3200}$):

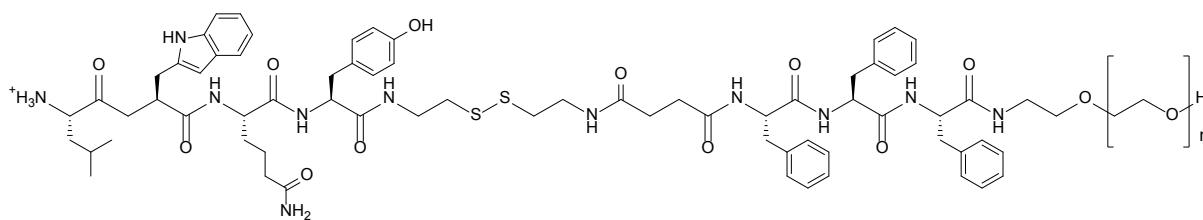


Abbildung 97. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **PI-ds**.

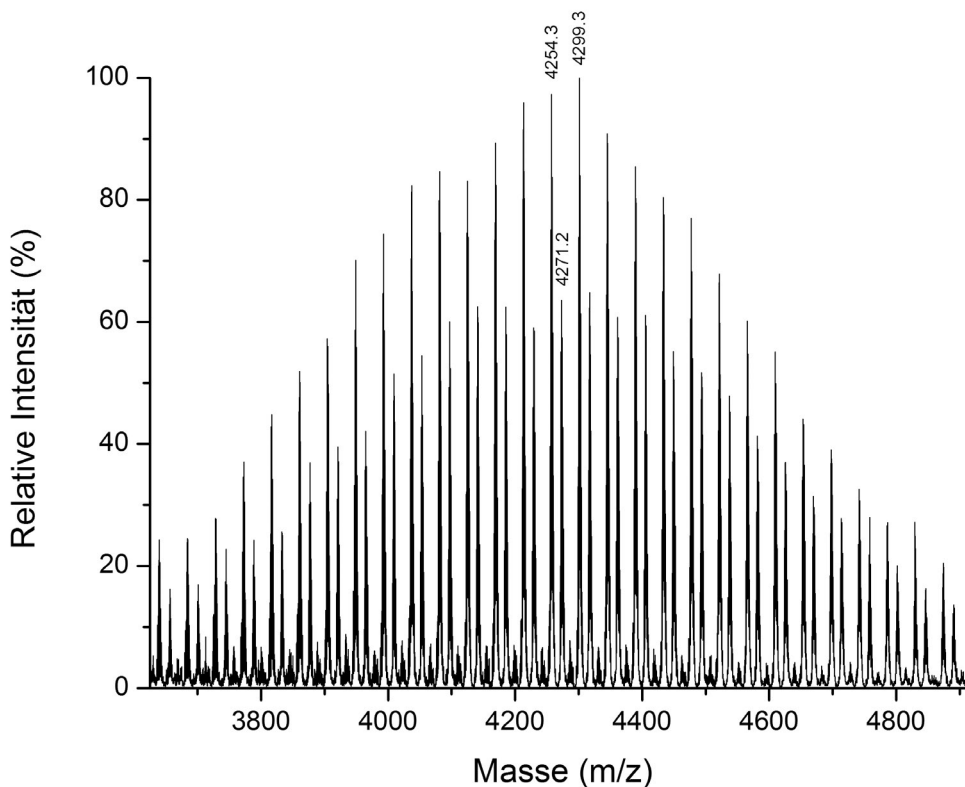


Abbildung 98. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **PI-ds**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **PI-ds**:

$$M_{\text{peak}}[M+\text{Na}]^+ = m/z \ 4254.3$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+\text{Na}]^+ = 4254.3 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[M+\text{K}]^+ = m/z \ 4271.2$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+\text{K}]^+ = 4270.3 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 45.0 \text{ g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO}(65)} + M_{\text{Na}} = 4254.3 \text{ g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 0.1 \text{ g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.31 (m, 22H, CH^{Ar} Phe, Tyr, Trp), 6.91 (m, 2H, *meta*- CH^{Ar} Tyr), 4.84 – 4.53 (m, 6H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Gln, Phe, Trp, Tyr), 3.92 (m, 333H, CH_2 PEO), 3.18 – 2.78 (m, 16H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Phe, Trp, Tyr, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Gln), 2.76 – 2.33 (m, 4H, CH_2 CDS), 1.88 – 1.64 (m, 2H, CH Leu), 1.08 – 0.87 (m, 6H, CH_3 Leu).

FT-IR: (ν (cm^{-1})): 3280 (m), 2879 (m), 1661 (m), 1632 (s), 1542 (m), 1518 (m), 1466 (m), 1455 (m), 1392 (w), 1359 (m), 1342 (m), 1280 (m), 1241 (m), 1202 (w), 1145 (s), 1061 (s), 961(m), 841 (m), 799 (w), 743 (w), 720 (w), 698 (m), 666 (w), 641 (w), 623 (w), 577 (w), 558 (w), 528 (w), 506 (w).

PII-ds ($\text{H}_2\text{N-LFLY-CDS-WFL-PEO}_{3200}$):

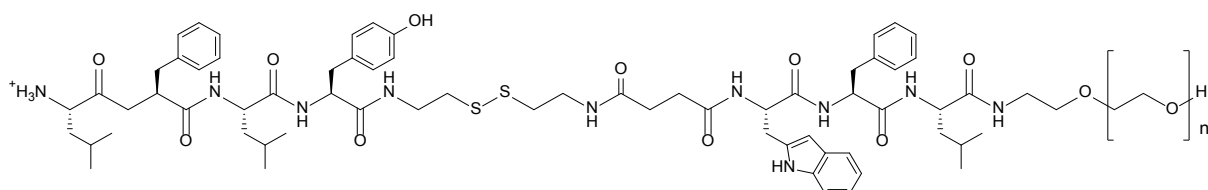


Abbildung 99. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **PII-ds**.

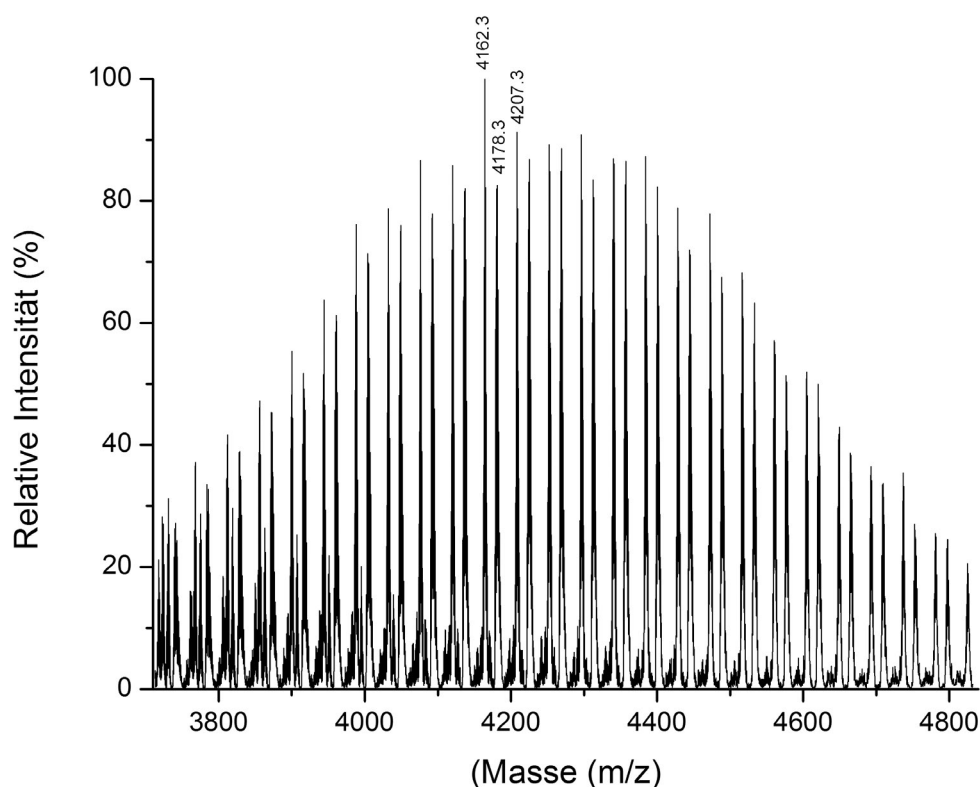


Abbildung 100. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **PII-ds**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **PII-ds**:

$$M_{\text{peak}}[M+\text{Na}]^+ = m/z \ 4162.3$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+\text{Na}]^+ = 4161.6 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[M+\text{K}]^+ = m/z \ 4178.3$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+\text{K}]^+ = 4177.6 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 45.5 \text{ g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO}(64)} + M_{\text{Na}} = 4161.6 \text{ g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 0.6 \text{ g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.54 – 6.80 (m, 19H, $\text{C}^{\text{Ar}}\text{H}$ Phe, Trp, Tyr), 5.08 – 4.53 (m, 6H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu, Phe, Trp, Tyr), 4.00 – 3.66 (m, 333H, CH_2 PEO), 1.90 – 1.26 (m, 10H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Leu, Phe, Trp, Tyr, CH_2 CDS), 0.89 (t, $J = 16.1 \text{ Hz}$, 21H, CH_3 Leu, CH Leu).

FT-IR: (ν (cm^{-1})): 3277 (m), 2878 (m), 1738 (m), 1635 (m), 1541 (m), 1466 (m), 1360 (m), 1342 (s), 1279 (m), 1240 (m), 1217 (w), 1204 (w), 1146 (m), 1099 (s), 1060 (s), 961 (s), 842 (s), 740 (w), 699 (m), 602 (w), 580 (w), 556 (w), 528 (w), 508 (w).

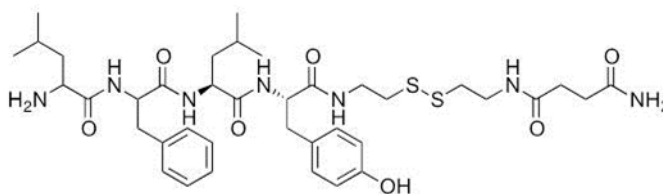
PII(1-4)CDS (H_2N -LFLY-CDS):

Abbildung 101. Strukturformel des Peptids **PII(1-4)CDS**.

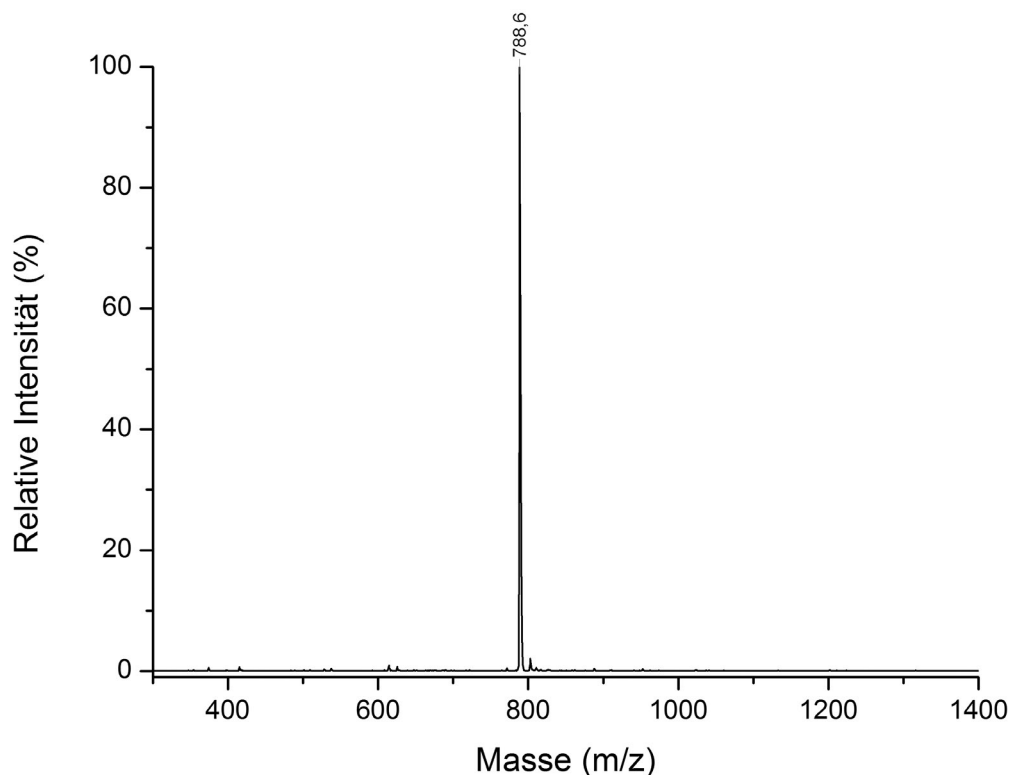


Abbildung 102. ESI-ToF-MS-Spektrum des Peptids **PII(1-4)CDS**.

ESI-TOF-MS-Analyse von **PII(1-4)CDS**:

ESI: m/z $[C_{38}H_{57}N_7O_7S_2]_{\text{peak}} = 788.6$; $[C_{38}H_{57}N_7O_7S_2]_{\text{berechnet}} = 788.03 \text{ g/mol}$

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.21 (d, $J = 64.3$, 5H, $C^{\text{Ar}}\text{H}$ Phe), 7.07 (m, 2H, $C^{\text{Ar}}\text{H}$ Tyr), 6.94 (m, 2H, *meta*- $C^{\text{Ar}}\text{H}$ Tyr), 4.93 (t, $J = 7.53$ Hz, 1H, $C^{\alpha}\text{H}$ Phe), 4.75 (t, $J = 7.53$ Hz, 1H, $C^{\alpha}\text{H}$ Tyr), 4.67 (dd, $J = 9.56$, 4.46 Hz, 1H, $C^{\alpha}\text{H}$ Leu), 3.83 (t, $J = 6.3$, 2H, CH_2 Phe), 3.72 – 3.49 (m, 2H, $C^{\alpha}\text{H}$ Phe), 3.09 (t, $J = 12.43$ Hz, 4H, CH_2 CDS), 2.85 (t, $J = 6.30$ Hz, 2H, CH_2 CDS), 2.74 – 2.53 (m, 2H, CH_2 CDS), 1.74 – 1.41 (m, 2H, $C^{\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1.91 – 1.74 (m, 4H, CH_2 Leu), 1.03 – 0.93 (m, 6H, CH_3 Leu), 0.93 – 0.80 (m, 6H, CH_3 Leu).

FT-IR: (ν (cm^{-1})): 3277 (m), 3083 (w), 2957 (m), 2927 (m), 2873 (w), 1638 (s), 1517 (m), 1439 (w), 1362 (w), 1235 (vw), 1198 (m), 1133 (m), 1033 (m), 834 (m), 719 (m), 698 (m), 590 (vw), 514 (w), 459 (w).

PI_{Ce6} (H₂N-QFQQSFF-PEO₃₂₀₀):

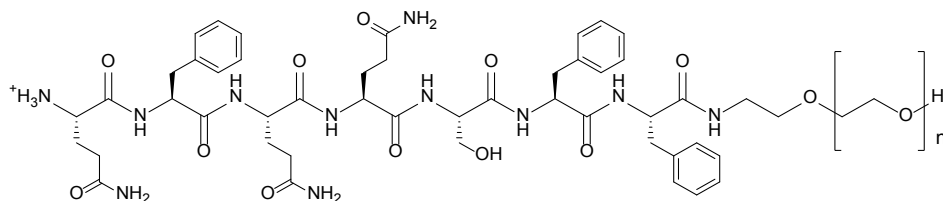


Abbildung 103. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **PI_{Ce6}**.

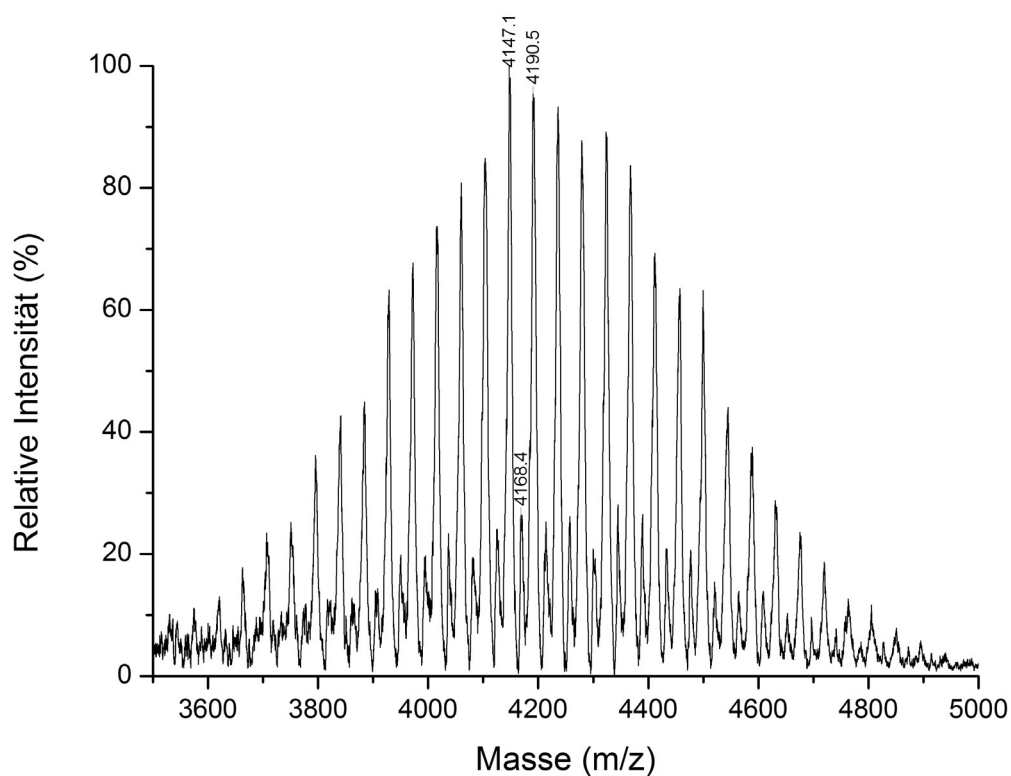


Abbildung 104. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **PI_{Ce6}**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **PI_{Ce6}**:

$$M_{\text{peak}}[M+H]^+ = m/z \ 4147.1$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+H]^+ = 4146.7 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[M+Na]^+ = m/z \ 4168.4$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+Na]^+ = 4168.7 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 43.4 \text{ g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO}(71)} + M_{\text{H}} = 4146.7 \text{ g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 0.4 \text{ g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.29 – 7.07 (m, 15H, CH^{Ar} Phe), 4.91 – 4.57 (m, 7H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.14 – 3.62 (m, 324H, PEO), 3.53 – 3.43 (m, 2H, CH_2 Ser), 3.20 – 2.94 (m, 6H, CH_2 Phe), 2.82 – 2.07 (m, 12H, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Gln).

Das Verhältnis zwischen Peptid und Ethylenoxid wurde durch den Vergleich der Integrale der 15 H von CH^{Ar} Phe bei 7.29 – 7.07 ppm und 324 H von PEO bei 4.14 – 3.62 ppm berechnet. Es entspricht einem Verhältnis von 1 : 81.

FT-IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$): 3277 (s), 3084 (w), 2880 (s), 1633 (s), 1541 (m), 1518 (m), 1463 (w), 1344 (m), 1280 (w), 1238 (w), 1198 (w), 1101 (s), 1063 (m), 958 (m), 840 (m), 745 (w), 698 (m), 589 (vw), 515 (w), 460 (vw).

PII_{Ce6} (H₂N-QLLLQLF-PEO₃₂₀₀):

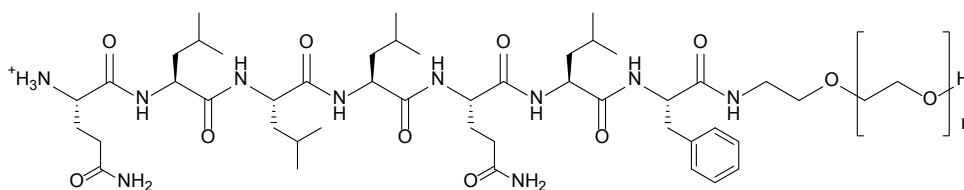


Abbildung 105. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **PII_{Ce6}**.

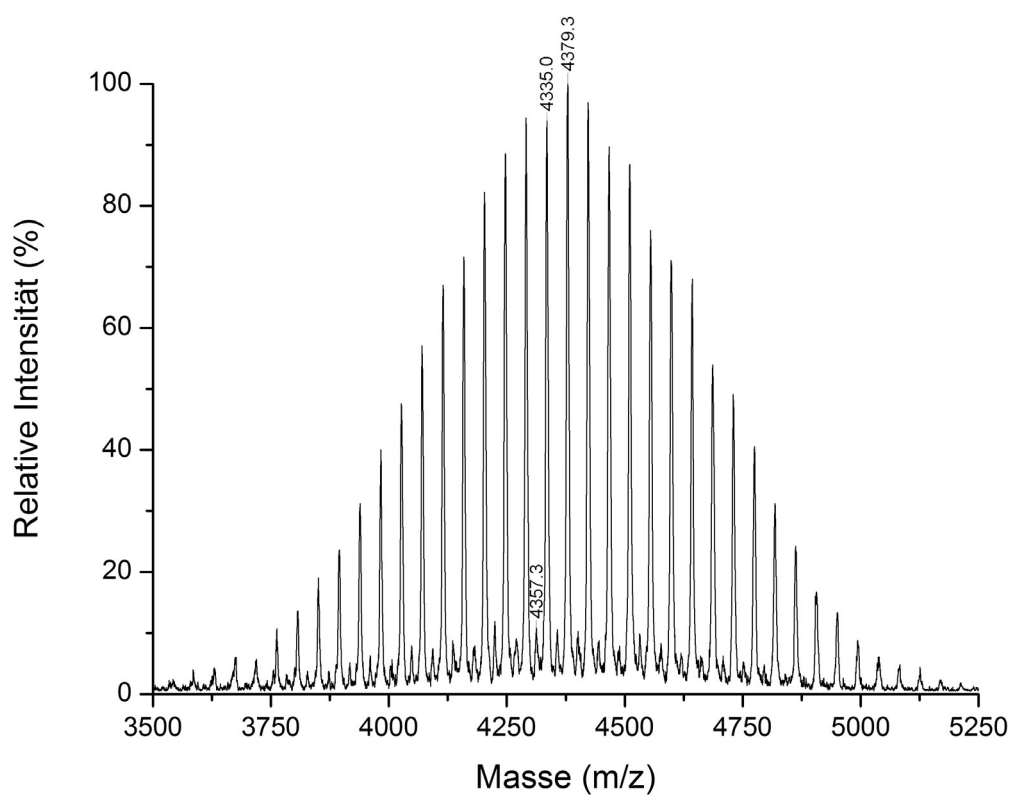


Abbildung 106. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **PII_{Ce6}**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **PII_{Ce6}**:

$$M_{\text{peak}}[\text{M}+\text{Na}]^{+} = m/z \ 4334.8$$

$$M_{\text{berechnet}}[\text{M}+\text{Na}]^{+} = 4335.0 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[\text{M}+\text{H}]^{+} = m/z \ 4357.3$$

$$M_{\text{berechnet}}[\text{M}+\text{H}]^{+} = 4356.4 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 44.4 \text{ g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO(76)}} + M_{\text{Na}} = 4335.0 \text{ g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 0.8 \text{ g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.29 – 7.12 (m, 5H, CH^{Ar} Phe), 4.77 – 4.50 (m, 7H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.02 – 3.67 (m, 340H, PEO), 3.12 – 3.06 (m, 2H, CH_2 Phe), 2.85 – 2.38 (m, 8H, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Gln), 1.73 – 1.53 (m, 12H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ $\text{C}^{\gamma}\text{H}$ Leu), 0.96 – 0.83 (m, 24H, CH_3 Leu).

Das Verhältnis zwischen Peptid und Ethylenoxid wurde durch den Vergleich der Integrale der 5 H von CH^{Ar} Phe bei 7.29 – 7.12 ppm und 340 H von PEO bei 4.02 – 3.67 ppm berechnet. Es entspricht einem Verhältnis von 1 : 85.

FT-IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$): 3273 (m), 3084 (w), 2883 (s), 2742 (w), 1676 (m), 1627 (m), 1534 (m), 1465 (m), 1343 (m), 1280 (m), 1240 (m), 1201 (w), 1144 (m), 1100 (s), 959 (m), 841 (m), 747 (w), 700 (w), 588 (vw), 513 (vw), 453 (vw).

PI_{Pba} (H₂N-FQLFQLQ-PEO₃₂₀₀):

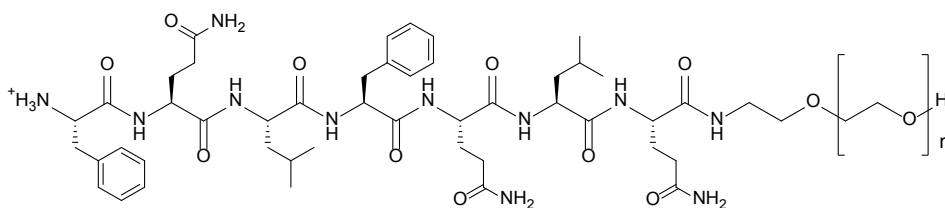


Abbildung 107. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **PI_{Pba}**.

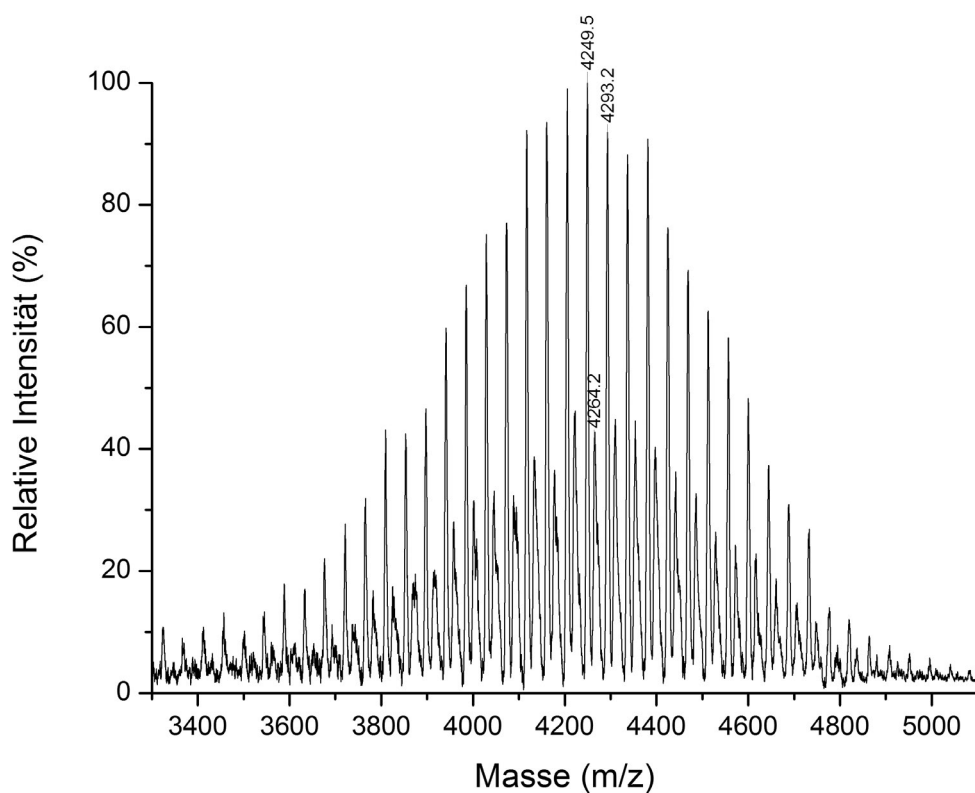


Abbildung 108. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **PI_{Pba}**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **PI_{Pba}**:

$$M_{\text{peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 4249.5$$

$$M_{\text{berechnet}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4247.9 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[\text{M}+\text{K}]^+ = m/z \ 4264.2$$

$$M_{\text{berechnet}}[\text{M}+\text{K}]^+ = 4263.9 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 43.7 \text{ g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO}(73)} + M_{\text{Na}} = 4247.9 \text{ g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 1.6 \text{ g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.32 – 7.06 (m, 10H, CH^{Ar} Phe), 4.88 – 4.52 (m, 7H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.05 – 3.69 (m, 360H, PEO), 3.29 – 3.00 (m, 4H, CH_2 Phe), 2.70 – 1.98 (m, 12H, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Gln), 1.78 – 1.52 (m, 6H, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Leu), 1.01 – 0.89 (m, 12H, CH_3 Leu).

Das Verhältnis zwischen Peptid und Ethylenoxid wurde durch den Vergleich der Integrale der 10 H von CH^{Ar} Phe bei 7.32 – 7.06 ppm und 360 H von PEO bei 4.05 – 3.69 ppm berechnet. Es entspricht einem Verhältnis von 1 : 90.

FT-IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$): 3274 (m), 3084 (vw), 2882 (s), 2742 (vw), 1659 (m), 1626 (s), 1539 (m), 1465 (m), 1411 (vw), 1343 (m), 1280 (m), 1240 (m), 1201 (vw), 1145 (m), 1100 (s), 959 (m), 842 (m), 744 (vw), 699 (w), 587 (vw), 513 (w), 459 (vw).

PII_{Pba} (H₂N-FLFKEKS-PEO₃₂₀₀):

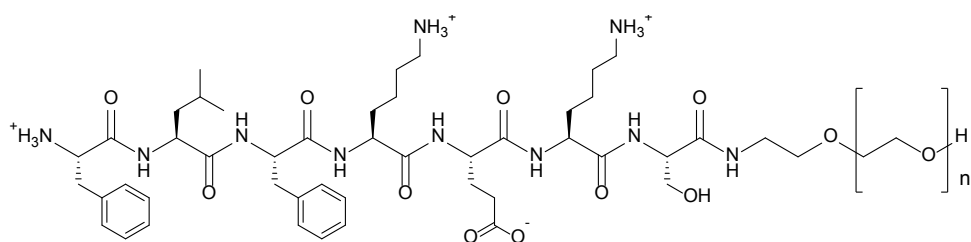


Abbildung 109. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **PII_{Pba}**.

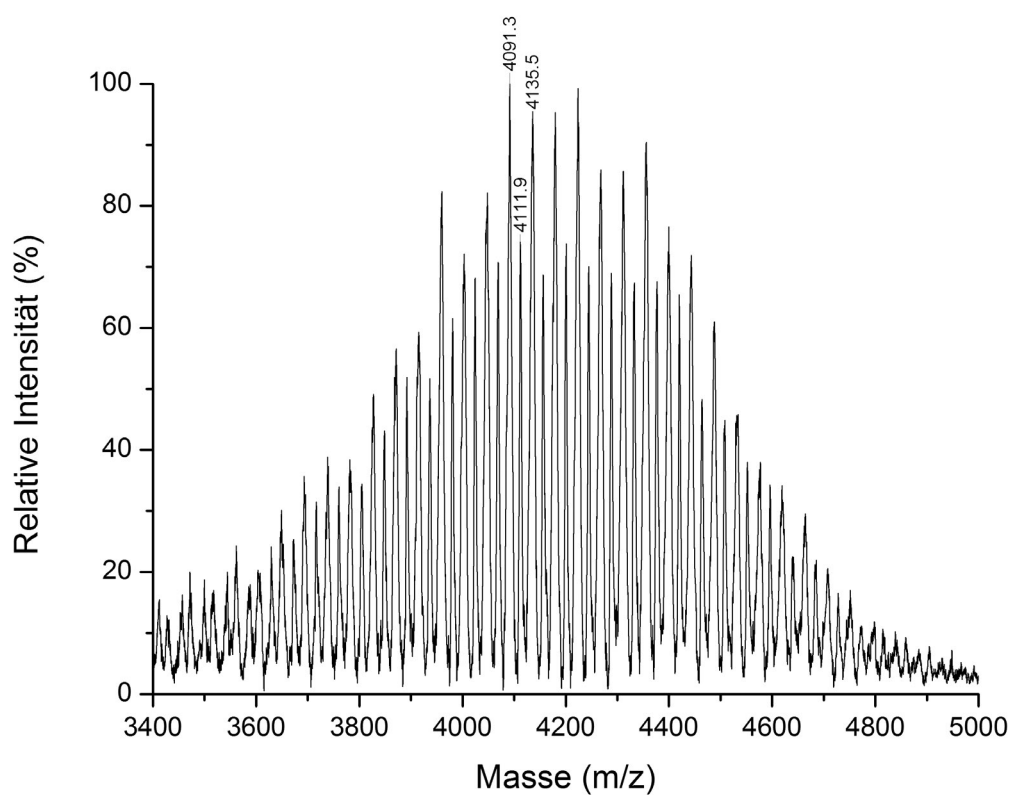


Abbildung 110. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **PII_{Pba}**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **PII_{Pba}**:

$$M_{\text{peak}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z \ 4091.3$$

$$M_{\text{berechnet}}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 4091.7 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z \ 4111.9$$

$$M_{\text{berechnet}}[\text{M}+\text{H}]^+ = 4113.7 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 44.1$ g/mol (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO}(70)} + M_{\text{H}} = 4091.7$ g/mol. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von ± 0.4 g/mol bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.33 – 7.05 (m, 10H, CH^{Ar} Phe), 4.72 – 4.54 (m, 7H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.03 – 3.74 (m, 340H, PEO), 3.27 – 3.03 (m, 8H, CH_2 Phe, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Glu), 2.67 – 2.54 (m, 2H, CH_2 Ser), 1.90 – 1.69 (m, 8H, $\text{C}^{\beta+\delta}\text{H}_2$ Lys), 1.61 – 1.41 (m, 8H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Lys, CH_2 CH Leu), 0.90 – 0.79 (m, 6H, CH_3 Leu).

Das Verhältnis zwischen Peptid und Ethylenoxid wurde durch den Vergleich der Integrale der 10 H von CH^{Ar} Phe bei 7.33 – 7.05 ppm und 340 H von PEO bei 4.03 – 3.74 ppm berechnet. Es entspricht einem Verhältnis von 1 : 85.

FT-IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$): 3417 (vw), 3272 (m), 3085 (w), 2882 (s), 2742 (w), 1663 (m), 1632 (s), 1550 (m), 1466 (m), 1411 (m), 1343 (m), 1280 (m), 1241 (m), 1202 (vw), 1145 (m), 1098 (s), 958 (m), 842 (m), 704 (w), 588 (w), 515 (w), 459 (vw).

Rho-PII (Rho-GGQFFLFFQ-PEO₃₂₀₀):

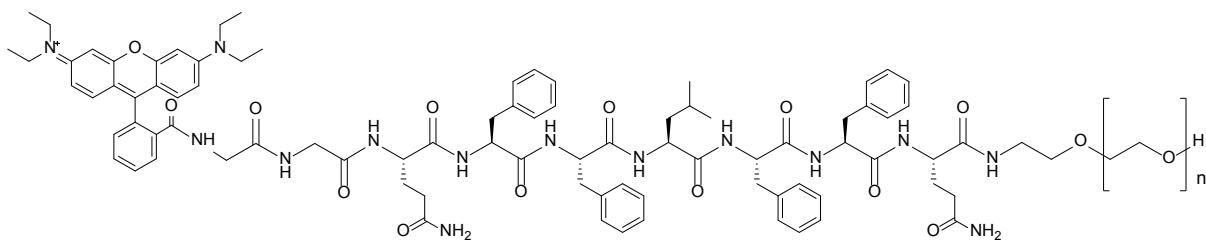


Abbildung 111. Strukturformel des Peptid-PEO-Konjugats **Rho-PII**.

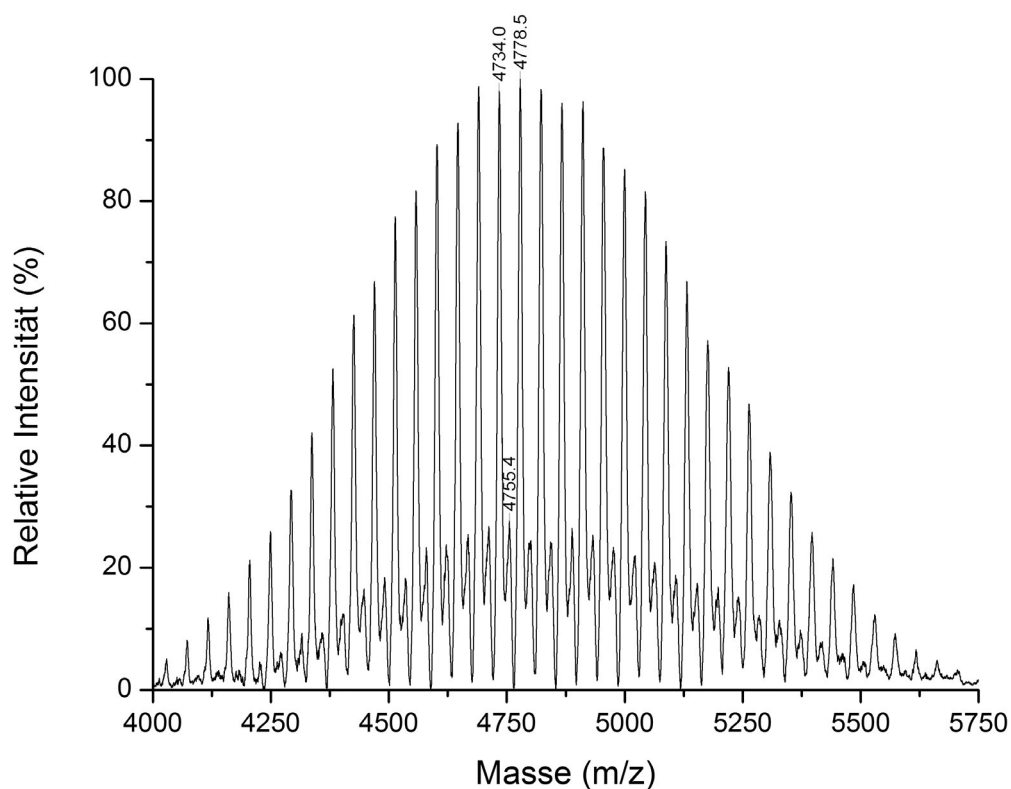


Abbildung 112. MALDI-ToF-MS-Spektrum des Peptid-PEO-Konjugats **Rho-PII**.

MALDI-TOF-MS-Analyse von **Rho-PII**:

$$M_{\text{peak}}[M+H]^+ = m/z \quad 4734.0$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+H]^+ = 4731.5 \text{ g/mol}$$

$$M_{\text{peak}}[M+Na]^+ = m/z \quad 4755.4$$

$$M_{\text{berechnet}}[M+Na]^+ = 4753.5 \text{ g/mol}$$

$\Delta m = 44.5 \text{ g/mol}$ (Ethylenoxid-Wiederholungseinheiten).

$M = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEO}(72)} + M_{\text{H}} = 4731.5 \text{ g/mol}$. Die Signale konnten mit einer Genauigkeit von $\pm 2.5 \text{ g/mol}$ bestätigt werden.

^1H NMR (500 MHz, TFA-d, δ in ppm): 7.84 – 7.01 (m, 30H, CH^{Ar} Phe, CH^{Ar} Rho), 5.02 – 4.71 (m, 7H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 4.33 (s, 2H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Gly), 4.21 (s, 2H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Gly), 4.18 – 3.61 (m, 268H, PEO), 3.25 – 2.64 (m, 16H, CH_2 Phe, CH_2 Rho), 2.48 – 2.18 (m, 8H, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Gln), 1.69 – 1.60 (m, 3H, $\text{C}^{\beta+\gamma}\text{H}_2$ Leu), 0.5 (s, 18H, CH_3 Leu).

Das Verhältnis zwischen Peptid und Ethylenoxid wurde durch den Vergleich der Integrale der 30 H von CH^{Ar} Phe bei 7.84 – 7.01 ppm und 268 H von PEO bei 4.18 – 3.61 ppm berechnet. Es entspricht einem Verhältnis von 1 : 67.

FT-IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$): 3414 (w), 3272 (m), 3085 (w), 2882 (s), 2742 (w), 1663 (m), 1632 (s), 1550 (m), 1466 (m), 1411 (vw), 1343 (m), 1280 (m), 1240 (m), 1202 (vw), 1156 (m), 1098 (s), 958 (m), 845 (m), 704 (w), 587 (w), 515 (w), 456 (vw).

8. Referenzen

- (1) Senge, M. O.; Brandt, J. C. **Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin) - A Second-generation Photosensitizer** *Photochemistry and Photobiology* **2011**, 87, 1240.
- (2) Roeder, B.; Naether, D.; Lewald, T.; Braune, M.; Nowak, C.; Freyer, W. **Photophysical properties and photodynamic activity in vivo of some tetrapyrroles** *Biophysical Chemistry* **1990**, 35, 303.
- (3) Chen, K.; Preuß, A.; Hackbarth, S.; Wacker, M.; Langer, K.; Röder, B. **Novel photosensitizer-protein nanoparticles for Photodynamic therapy: Photophysical characterization and in vitro investigations** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2009**, 96, 66.
- (4) Isakau, H. A.; Trukhacheva, T. V.; Zhebentyaev, A. I.; Petrov, P. T. **HPLC study of chlorin e6 and its molecular complex with polyvinylpyrrolidone** *Biomedical Chromatography* **2007**, 21, 318.
- (5) Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. **How many drug targets are there?** *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 993.
- (6) Westermann, P.; Glanzmann, T.; Andrejevic, S.; Braichotte, D. R.; Forrer, M.; Wagnieres, G. A.; Monnier, P.; van den Bergh, H.; Mach, J.-P.; Folli, S. **Long circulating half-life and high tumor selectivity of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenylchlorin conjugated to polyethylene glycol in nude mice grafted with a human colon carcinoma** *International Journal of Cancer* **1998**, 76, 842.
- (7) Karin, L.; Thomas, K.; Sylvia, W.; Arno, W.; Andrea, E.; Klaus, L.; Hagen von, B. **Comparison of intracellular accumulation and cytotoxicity of free m THPC and m THPC-loaded PLGA nanoparticles in human colon carcinoma cells** *Nanotechnology* **2011**, 22, 245102.
- (8) de Visscher, S. A. H. J.; Witjes, M. J. H.; van der Vegt, B.; de Bruijn, H. S.; van der Ploeg – van den Heuvel, A.; Amelink, A.; Sterenborg, H. J. C. M.; Roodenburg, J. L. N.; Robinson, D. J. **Localization of liposomal mTHPC formulations within normal epithelium, dysplastic tissue, and carcinoma of oral epithelium in the 4NQO-carcinogenesis rat model** *Lasers in Surgery and Medicine* **2013**, 45, 668.
- (9) Hopkins, A. L.; Groom, C. R. **The druggable genome** *Nat Rev Drug Discov* **2002**, 1, 727.
- (10) Schirle, M.; Bantscheff, M.; Kuster, B. **Mass Spectrometry-Based Proteomics in Preclinical Drug Discovery** *Chemistry & Biology*, 19, 72.
- (11) Borhani, D. W.; Shaw, D. E. **The future of molecular dynamics simulations in drug discovery** *J. Computer-Aided Mol. Des.* **2012**, 26, 15.
- (12) Ekins, S.; Mestres, J.; Testa, B. **In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling** *British Journal of Pharmacology* **2007**, 152, 9.
- (13) Paul, S. M.; Mytelka, D. S.; Dunwiddie, C. T.; Persinger, C. C.; Munos, B. H.; Lindborg, S. R.; Schacht, A. L. **How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge** *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9, 203.
- (14) DiMasi, J. A. **New drug development in the United States from 1963 to 1999** *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2001**, 69, 286.

- (15) DiMasi, J. A.; Hansen, R. W.; Grabowski, H. G. **The price of innovation: new estimates of drug development costs** *Journal of Health Economics* **2003**, *22*, 151.
- (16) Light, D. W.; Warburton, R. **Demythologizing the high costs of pharmaceutical research** *BioSocieties* **2011**, *6*, 34.
- (17) Schuhmacher, A.; Germann, P.-G.; Trill, H.; Gassmann, O. **Models for open innovation in the pharmaceutical industry** *Drug Discovery Today* **2013**, *18*, 1133.
- (18) Kola, I. **The State of Innovation in Drug Development** *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2008**, *83*, 227.
- (19) Lichtenberg, F. **The Impact of New Drug Launches on Longevity: Evidence from Longitudinal, Disease-Level Data from 52 Countries, 1982–2001** *Int. J. Health Care Finance Econ.* **2005**, *5*, 47.
- (20) Bleicher, K. H.; Bohm, H.-J.; Muller, K.; Alanine, A. I. **Hit and lead generation: beyond high-throughput screening** *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 369.
- (21) **Initial sequencing and analysis of the human genome** *Nature* **2001**, *409*, 860.
- (22) Inglese, J.; Shamu, C. E.; Guy, R. K. **Reporting data from high-throughput screening of small-molecule libraries** *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 438.
- (23) Bajorath, J. **Integration of virtual and high-throughput screening** *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 882.
- (24) Diller, D. J.; Merz, K. M. **High throughput docking for library design and library prioritization** *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2001**, *43*, 113.
- (25) Carr, R. A. E.; Congreve, M.; Murray, C. W.; Rees, D. C. **Fragment-based lead discovery: leads by design** *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 987.
- (26) Erhardt, P. In *Pharmacology: Principles and Practice*; Bachmann, M. H. M., Ed.; Academic Press: San Diego, 2009, p 475.
- (27) Jandeleit, B.; Schaefer, D. J.; Powers, T. S.; Turner, H. W.; Weinberg, W. H. **Kombinatorische Materialforschung und Katalyse** *Angewandte Chemie* **1999**, *111*, 2648.
- (28) Carell, T.; Wintner, E. A.; Sutherland, A. J.; Rebek Jr, J.; Dunayevskiy, Y. M.; Vouros, P. **New promise in combinatorial chemistry: synthesis, characterization, and screening of small-molecule libraries in solution** *Chemistry & Biology* **1995**, *2*, 171.
- (29) Smith, P. W.; Lai, J. Y. Q.; Whittington, A. R.; Cox, B.; Houston, J. G.; Harri.Stylli, C.; Banks, M. N.; Tiller, P. R. **Synthesis and biological evaluation of a library containing potentially 1600 amides / esters. A strategy for rapid compound generation and screening** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1994**, *4*, 2821.
- (30) Pirrung, M. C.; Chen, J. **Preparation and Screening against Acetylcholinesterase of a Non-Peptide "Indexed" Combinatorial Library** *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 1240.
- (31) Carell, T.; Wintner, E. A.; Bashir-Hashemi, A.; Rebek, J. **A Novel Procedure for the Synthesis of Libraries Containing Small Organic Molecules** *Angewandte Chemie International Edition in English* **1994**, *33*, 2059.
- (32) Leznoff, C. C. **The use of insoluble polymer supports in general organic synthesis** *Accounts of Chemical Research* **1978**, *11*, 327.
- (33) Worster, P. M.; McArthur, C. R.; Leznoff, C. C. **Asymmetrische Synthese von 2-Alkylcyclohexanon an festen Trägern** *Angewandte Chemie* **1979**, *91*, 255.
- (34) Fréchet, J. M. J. **Tetrahedron report number 103 : Synthesis and applications of organic polymers as supports and protecting groups** *Tetrahedron* **1981**, *37*, 663.

- (35) Schuerch, C.; Frechet, J. M. **Solid-phase synthesis of oligosaccharides. I. Preparation of the solid support. Poly[p-(1-propen-3-ol-1-yl)styrene]** *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93*, 492.
- (36) Gennari, C.; Nestler, H. P.; Salom, B.; Still, W. C. **Solid-Phase Synthesis of Vinylogous Sulfonyl Peptides** *Angewandte Chemie International Edition in English* **1995**, *34*, 1763.
- (37) Kick, E. K.; Ellman, J. A. **Expedient Method for the Solid-Phase Synthesis of Aspartic Acid Protease Inhibitors Directed toward the Generation of Libraries** *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, *38*, 1427.
- (38) Boojamra, C. G.; Burow, K. M.; Ellman, J. A. **An expedient and high-yielding method for the solid-phase synthesis of diverse 1,4-benzodiazepine-2,5-diones** *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60*, 5742.
- (39) Yu, K.-L.; Deshpande, M. S.; Vyas, D. M. **Heck reactions in solid phase synthesis** *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 8919.
- (40) Frenette, R.; Friesen, R. W. **Biaryl synthesis via suzuki coupling on a solid support** *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 9177.
- (41) Kurth, M. J.; Ahlberg Randall, L. A.; Chen, C.; Melander, C.; Miller, R. B.; McAlister, K.; Reitz, G.; Kang, R.; Nakatsu, T.; Green, C. **Library-Based Lead Compound Discovery: Antioxidants by an Analogous Synthesis/Deconvolutive Assay Strategy** *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 5862.
- (42) Ritter, H.; Sperber, R. **Diels-Alder Reactions in Polymer Chemistry: Synthesis of Pyridoxine on a Polymeric Backbone** *Macromolecules* **1994**, *27*, 5919.
- (43) Pei, Y.; Moos, W. H. **Post-modification of peptoid side chains: [3+2] cycloaddition of nitrile oxides with alkenes and alkynes on the solid-phase** *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 5825.
- (44) Murphy, A. M.; Dagnino, R.; Vallar, P. L.; Trippe, A. J.; Sherman, S. L.; Lumpkin, R. H.; Tamura, S. Y.; Webb, T. R. **Automated synthesis of peptide C-terminal aldehydes** *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 3156.
- (45) Moon, H. S.; Schore, N. E.; Kurth, M. J. **A polymer-supported chiral auxiliary applied to the iodolactonization reaction: preparation of .gamma.-butyrolactones** *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 6088.
- (46) Schuster, M.; Wang, P.; Paulson, J. C.; Wong, C.-H. **Solid-Phase Chemical-Enzymic Synthesis of Glycopeptides and Oligosaccharides** *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 1135.
- (47) Halcomb, R. L.; Huang, H.; Wong, C.-H. **Solution- and Solid-Phase Synthesis of Inhibitors of H. pylori Attachment and E-Selectin-Mediated Leukocyte Adhesion** *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 11315.
- (48) Merrifield, R. B. **Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide** *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2149.
- (49) Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J. **A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity** *Nature* **1991**, *354*, 82.
- (50) Li, W.; Xiao, X.; Czarnik, A. W. **Kinetic Comparison of Amide Formation on Various Cross-Linked Polystyrene Resins** *Journal of Combinatorial Chemistry* **1999**, *1*, 127.
- (51) Gooding, O. W.; Baudart, S.; Deegan, T. L.; Heisler, K.; Labadie, J. W.; Newcomb, W. S.; Porco, J. A.; van Eikeren, P. **On the Development of New**

- Poly(styrene–oxyethylene) Graft Copolymer Resin Supports for Solid-Phase Organic Synthesis** *Journal of Combinatorial Chemistry* **1999**, *1*, 113.
- (52) Adams, J. H.; Cook, R. M.; Hudson, D.; Jammalamadaka, V.; Lyttle, M. H.; Songster, M. F. **A Reinvestigation of the Preparation, Properties, and Applications of Aminomethyl and 4-Methylbenzhydrylamine Polystyrene Resins** *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 3706.
- (53) Atherton, E.; Clive, D. L. J.; Sheppard, R. C. **Polyamide supports for polypeptide synthesis** *Journal of the American Chemical Society* **1975**, *97*, 6584.
- (54) Auzanneau, F.-I.; Meldal, M.; Bock, K. **Synthesis, characterization and biocompatibility of PEGA resins** *Journal of Peptide Science* **1995**, *1*, 31.
- (55) Rademann, J.; Grötli, M.; Meldal, M.; Bock, K. **SPOCC: A Resin for Solid-Phase Organic Chemistry and Enzymatic Reactions on Solid Phase** *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 5459.
- (56) García-Martín, F.; Quintanar-Audelo, M.; García-Ramos, Y.; Cruz, L. J.; Gravel, C.; Furic, R.; Côté, S.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. **ChemMatrix, a Poly(ethylene glycol)-Based Support for the Solid-Phase Synthesis of Complex Peptides** *Journal of Combinatorial Chemistry* **2006**, *8*, 213.
- (57) García-Ramos, Y.; Paradis-Bas, M.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. **ChemMatrix® for complex peptides and combinatorial chemistry** *Journal of Peptide Science* **2010**, *16*, 675.
- (58) Williams, H. D.; Trevaskis, N. L.; Charman, S. A.; Shanker, R. M.; Charman, W. N.; Pouton, C. W.; Porter, C. J. H. **Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development** *Pharmacological Reviews* **2013**, *65*, 315.
- (59) Pardridge, W. M. **Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology** *Advanced Drug Delivery Reviews* **1995**, *15*, 5.
- (60) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings** *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 3.
- (61) Di, L.; Fish, P. V.; Mano, T. **Bridging solubility between drug discovery and development** *Drug Discovery Today* **2012**, *17*, 486.
- (62) Takagi, T.; Ramachandran, C.; Bermejo, M.; Yamashita, S.; Yu, L. X.; Amidon, G. L. **A Provisional Biopharmaceutical Classification of the Top 200 Oral Drug Products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan** *Molecular Pharmaceutics* **2006**, *3*, 631.
- (63) Basavaraj, S.; Betageri, G. V. **Can formulation and drug delivery reduce attrition during drug discovery and development—review of feasibility, benefits and challenges** *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2014**, *4*, 3.
- (64) Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. **Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives** *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 6288.
- (65) Almeida, A. J.; Souto, E. **Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins** *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*, 478.
- (66) Zhang, Y.; Chan, H. F.; Leong, K. W. **Advanced Materials and Processing for Drug Delivery: The Past and the Future** *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, *65*, 104.
- (67) Salmaso, S.; Caliceti, P. **Stealth Properties to Improve Therapeutic Efficacy of Drug Nanocarriers** *Journal of Drug Delivery* **2013**, *2013*, 19.
- (68) Kopeček, J. **Polymer–drug conjugates: Origins, progress to date and future directions** *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, *65*, 49.

- (69) Larson, N.; Ghandehari, H. **Polymeric conjugates for drug delivery** *Chemistry of materials : a publication of the American Chemical Society* **2012**, 24, 840.
- (70) Jatzkewitz, H. **An ein kolloidales Blutplasma-Ersatzmittel (Polyvinylpyrrolidon) gebundenes Peptamin (Glycyl-L-leucyl-mezcalin) als neuartige Depotform für biologisch aktive primäre Amine (Mezcalin)** *Z. Naturforschg.* **1955**, 10 b, 27
- (71) Shumikina, K. I. P., E.F.; Ushakov, S.N. **Experimental study of polymer salts of penicillins (in Russian)** *Antibiotiki* **1966**, 11, 767
- (72) Vasey, P. A.; Kaye, S. B.; Morrison, R.; Twelves, C.; Wilson, P.; Duncan, R.; Thomson, A. H.; Murray, L. S.; Hilditch, T. E.; Murray, T.; Burtles, S.; Fraier, D.; Frigerio, E.; Cassidy, J. **Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of PK1 [N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer Doxorubicin]: First Member of a New Class of Chemotherapeutic Agents—Drug-Polymer Conjugates** *Clinical Cancer Research* **1999**, 5, 83.
- (73) Seymour, L. W., Ferry, D. R., Kerr, D. J., Rea, D., Whitlock, M., Poyner, R., Boivin, C., Hesslewood, S., Twelves, C., Blackie, R., Schatzlein, A., Jodrell, D., Bissett, D., Calvert, H., Lind, M., Robbins, A., Burtles, S., Duncan, R., Cassidy **Phase II studies of polymer-doxorubicin (PK1, FCE28068) in the treatment of breast, lung and colorectal cancer** *International Journal of Oncology* **2009**, 34, 1629
- (74) Meerum Terwogt, J. M.; ten Bokkel Huinink, W. W.; Schellens, J. H.; Schot, M.; Mandjes, I. A.; Zurlo, M. G.; Rocchetti, M.; Rosing, H.; Koopman, F. J.; Beijnen, J. H. **Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU166945, a novel water-soluble polymer-conjugated prodrug of paclitaxel** *Anti-Cancer Drugs* **2001**, 12, 315.
- (75) Rademaker-Lakhai, J. M.; Terret, C.; Howell, S. B.; Baud, C. M.; de Boer, R. F.; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M.; Droz, J.-P. **A Phase I and Pharmacological Study of the Platinum Polymer AP5280 Given as an Intravenous Infusion Once Every 3 Weeks in Patients with Solid Tumors** *Clinical Cancer Research* **2004**, 10, 3386.
- (76) Minko, T.; Kopečková, P.; Kopeček, J. **Comparison of the Anticancer Effect of Free and HPMa Copolymer-Bound Adriamycin in Human Ovarian Carcinoma Cells** *Pharm. Res.* **1999**, 16, 986.
- (77) Fowers, K. D.; Kopeček, J. **Targeting of Multidrug-Resistant Human Ovarian Carcinoma Cells With Anti-P-Glycoprotein Antibody Conjugates** *Macromolecular Bioscience* **2012**, 12, 502.
- (78) Batrakova, E. V.; Li, S.; Brynskikh, A. M.; Sharma, A. K.; Li, Y.; Boska, M.; Gong, N.; Mosley, R. L.; Alakhov, V. Y.; Gendelman, H. E.; Kabanov, A. V. **Effects of Pluronic and Doxorubicin on Drug Uptake, Cellular Metabolism, Apoptosis and Tumor Inhibition in Animal Models of MDR Cancers** *Journal of controlled release* **2010**, 143, 290.
- (79) Börner, H. G. **Precision Polymers—Modern Tools to Understand and Program Macromolecular Interactions** *Macromolecular Rapid Communications* **2011**, 32, 115.
- (80) Gong, J.; Chen, M.; Zheng, Y.; Wang, S.; Wang, Y. **Polymeric micelles drug delivery system in oncology** *Journal of Controlled Release* **2012**, 159, 312.

- (81) Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. **Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance** *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *47*, 113.
- (82) Gaucher, G.; Dufresne, M.-H.; Sant, V. P.; Kang, N.; Maysinger, D.; Leroux, J.-C. **Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery** *Journal of Controlled Release* **2005**, *109*, 169.
- (83) Alakhov, V.; Klinski, E.; Li, S.; Pietrzynski, G.; Venne, A.; Batrakova, E.; Bronitch, T.; Kabanov, A. **Block copolymer-based formulation of doxorubicin. From cell screen to clinical trials** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, *16*, 113.
- (84) Svenson, S.; Tomalia, D. A. **Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field** *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57*, 2106.
- (85) Discher, B. M.; Won, Y.-Y.; Ege, D. S.; Lee, J. C.-M.; Bates, F. S.; Discher, D. E.; Hammer, D. A. **Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers** *Science* **1999**, *284*, 1143.
- (86) Wang, X.; Liu, G.; Hu, J.; Zhang, G.; Liu, S. **Concurrent Block Copolymer Polymersome Stabilization and Bilayer Permeabilization by Stimuli-Regulated “Traceless” Crosslinking** *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 3138.
- (87) Allen, T. M.; Cullis, P. R. **Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream** *Science* **2004**, *303*, 1818.
- (88) Li, B.; Xu, H.; Li, Z.; Yao, M.; Xie, M.; Shen, H.; Shen, S.; Wang, X.; Jin, Y. **Bypassing multidrug resistance in human breast cancer cells with lipid/polymer particle assemblies** *International Journal of Nanomedicine* **2012**, *7*, 187.
- (89) Pakunlu, R. I.; Wang, Y.; Tsao, W.; Pozharov, V.; Cook, T. J.; Minko, T. **Enhancement of the Efficacy of Chemotherapy for Lung Cancer by Simultaneous Suppression of Multidrug Resistance and Antiapoptotic Cellular Defense: Novel Multicomponent Delivery System** *Cancer Research* **2004**, *64*, 6214.
- (90) Blume, G.; Cevc, G. **Liposomes for the sustained drug release in vivo** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1990**, *1029*, 91.
- (91) Pack, D. W.; Hoffman, A. S.; Pun, S.; Stayton, P. S. **Design and development of polymers for gene delivery** *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 581.
- (92) Jhaveri, A. M.; Torchilin, V. P. **Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA** *Frontiers in Pharmacology* **2014**, *5*, 77.
- (93) Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E. **Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices** *Journal of Controlled Release* **2001**, *70*, 1.
- (94) Luckachan, G.; Pillai, C. K. S. **Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives** *J. Polym. Environ.* **2011**, *19*, 637.
- (95) Jain, R.; Shah, N. H.; Malick, A. W.; Rhodes, C. T. **Controlled Drug Delivery by Biodegradable Poly(Ester) Devices: Different Preparative Approaches** *Drug Development and Industrial Pharmacy* **1998**, *24*, 703.
- (96) Jain, R. A. **The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices** *Biomaterials* **2000**, *21*, 2475.
- (97) Budhian, A.; Siegel, S. J.; Winey, K. I. **Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles** *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *346*, 151.
- (98) Makadia, H. K.; Siegel, S. J. **Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier** *Polymers* **2011**, *3*, 1377.

- (99) Danhier, F.; Pourcelle, V.; Marchand-Brynaert, J.; Jérôme, C.; Feron, O.; Préat, V. In *Methods in Enzymology*; Nejat, D., Ed.; Academic Press: 2012; Vol. Volume 508, p 157.
- (100) Karra, N.; Nassar, T.; Ripin, A. N.; Schwob, O.; Borlak, J.; Benita, S. **Antibody Conjugated PLGA Nanoparticles for Targeted Delivery of Paclitaxel Palmitate: Efficacy and Biofate in a Lung Cancer Mouse Model** *Small* **2013**, *9*, 4221.
- (101) Pan, H.; Yang, J.; Kopečková, P.; Kopeček, J. **Backbone Degradable Multiblock N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer Conjugates via Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymerization and Thiol–ene Coupling Reaction** *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 247.
- (102) Chen, K.; Wacker, M.; Hackbarth, S.; Ludwig, C.; Langer, K.; Röder, B. **Photophysical evaluation of mTHPC-loaded HSA nanoparticles as novel PDT delivery systems** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2010**, *101*, 340.
- (103) Preuß, A.; Chen, K.; Hackbarth, S.; Wacker, M.; Langer, K.; Röder, B. **Photosensitizer loaded HSA nanoparticles II: In vitro investigations** *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *404*, 308.
- (104) Pasut, G.; Veronese, F. M. **Polymer–drug conjugation, recent achievements and general strategies** *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, 933.
- (105) Han, S.; Jhun, B. **Effect of additives on the cloud point of polyethylene glycols** *Arch. Pharm. Res.* **1984**, *7*, 1.
- (106) Ward, M. A.; Georgiou, T. K. **Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications** *Polymers* **2011**, *3*, 1215.
- (107) Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Migliardo, F.; Migliardo, P.; Romeo, G. **Hydration Study of PEG/Water Mixtures by Quasi Elastic Light Scattering, Acoustic and Rheological Measurements** *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 10272.
- (108) Zanini, S.; Müller, M.; Riccardi, C.; Orlandi, M. **Polyethylene Glycol Grafting on Polypropylene Membranes for Anti-fouling Properties** *Plasma Chem. Plasma Process.* **2007**, *27*, 446.
- (109) Abuchowski, A.; McCoy, J. R.; Palczuk, N. C.; van Es, T.; Davis, F. F. **Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase** *Journal of Biological Chemistry* **1977**, *252*, 3582.
- (110) Safra, T.; Muggia, F.; Jeffers, S.; Tsao-Wei, D. D.; Groshen, S.; Lyass, O.; Henderson, R.; Berry, G.; Gabizon, A. **Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): Reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m²** *Annals of Oncology* **2000**, *11*, 1029.
- (111) Peracchia, M. T.; Fattal, E.; Desmaële, D.; Besnard, M.; Noël, J. P.; Gomis, J. M.; Appel, M.; d'Angelo, J.; Couvreur, P. **Stealth® PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting** *Journal of Controlled Release* **1999**, *60*, 121.
- (112) Graham, M. L. **Pegaspargase: a review of clinical studies** *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 1293.
- (113) Rajender Reddy, K.; Modi, M. W.; Pedder, S. **Use of peginterferon alfa-2a (40 KD) (Pegasys®) for the treatment of hepatitis C** *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 571.

- (114) Johnson, W. **Final Report on the Safety Assessment of PEG-25 Propylene Glycol Stearate, PEG-75 Propylene Glycol Stearate, PEG-120 Propylene Glycol Stearate, PEG-10 Propylene Glycol, PEG-8 Propylene Glycol Cocoate, and PEG-55 Propylene Glycol Oleate** *Int. J. Toxicol.* **2001**, *20*, 13
- (115) Crampton, H. L.; Simanek, E. E. **Dendrimers as drug delivery vehicles: non-covalent interactions of bioactive compounds with dendrimers** *Polymer international* **2007**, *56*, 489.
- (116) Karshikoff, A. *Non-covalent interactions in proteins*; World Scientific, 2006.
- (117) Frieden, E. **Non-covalent interactions: Key to biological flexibility and specificity** *Journal of Chemical Education* **1975**, *52*, 754.
- (118) Deshayes, S.; Morris, M.; Heitz, F.; Divita, G. **Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy** *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 537.
- (119) Harvey Lodish, A. B., Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Mattgew P. Scott, Lawrence Zipursky, James Darnell. *Molecular Cell Biology*; 5th Edition ed.; W. H. Freeman: New York, 2003.
- (120) Perutz, M. F.; Rossmann, M. G.; Cullis, A. F.; Muirhead, H.; Will, G.; North, A. C. T. **Structure of Haemoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 5.5-[angst]. Resolution, Obtained by X-Ray Analysis** *Nature* **1960**, *185*, 416.
- (121) Eaton, W. A.; Henry, E. R.; Hofrichter, J.; Mozzarelli, A. **Is cooperative oxygen binding by hemoglobin really understood?** *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1999**, *6*, 351.
- (122) Friedman, M.; Walsh, G. **High performance films: Review of new materials and trends** *Polymer Engineering & Science* **2002**, *42*, 1756.
- (123) Das, T. K.; Prusty, S. **Review on Conducting Polymers and Their Applications** *Polymer-Plastics Technology and Engineering* **2012**, *51*, 1487.
- (124) Roy, D.; Brooks, W. L. A.; Sumerlin, B. S. **New directions in thermoresponsive polymers** *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 7214.
- (125) Yang, Y.; Urban, M. W. **Self-healing polymeric materials** *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 7446.
- (126) Ouchi, M.; Badi, N.; Lutz, J.-F.; Sawamoto, M. **Single-chain technology using discrete synthetic macromolecules** *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 917.
- (127) Lutz, J.-F.; Börner, H. G. **Modern trends in polymer bioconjugates design** *Progress in Polymer Science* **2008**, *33*, 1.
- (128) Canalle, L. A.; Lowik, D. W. P. M.; van Hest, J. C. M. **Polypeptide-polymer bioconjugates** *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 329.
- (129) Pasut, G.; Guiotto, A.; Veronese, F. **Protein, peptide and non-peptide drug PEGylation for therapeutic application** *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2004**, *14*, 859.
- (130) Gauthier, M. A.; Klok, H.-A. **Peptide/protein-polymer conjugates: synthetic strategies and design concepts** *Chemical Communications* **2008**, 2591.
- (131) Börner, H. G. **Strategies exploiting functions and self-assembly properties of bioconjugates for polymer and materials sciences** *Progress in Polymer Science* **2009**, *34*, 811.
- (132) Shu, J. Y.; Panganiban, B.; Xu, T. **Peptide-Polymer Conjugates: From Fundamental Science to Application** *Annual Review of Physical Chemistry* **2013**, *64*, 631.

- (133) Thordarson, P.; Le Droumaguet, B.; Velonia, K. **Well-defined protein–polymer conjugates—synthesis and potential applications** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *73*, 243.
- (134) Antos, J. M.; Francis, M. B. **Transition metal catalyzed methods for site-selective protein modification** *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, *10*, 253.
- (135) Wetzel, R.; Halualani, R.; Stults, J. T.; Quan, C. **A general method for highly selective crosslinking of unprotected polypeptides via pH-controlled modification of N-terminal .alpha.-amino groups** *Bioconjugate Chemistry* **1990**, *1*, 114.
- (136) Chan, W.; White, P. *Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach*; Oxford University Press, 2000.
- (137) Klok, H.-A. **Biological–synthetic hybrid block copolymers: Combining the best from two worlds** *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2005**, *43*, 1.
- (138) Wilken, J.; Kent, S. B. H. **Chemical protein synthesis** *Current Opinion in Biotechnology* **1998**, *9*, 412.
- (139) Chan, W. C., White, P. D. *Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach.*; Oxford University Press: New York, 2000.
- (140) O'Donnell, M. J.; Drew, M. D.; Pottorf, R. S.; Scott, W. L. **UPS on Weinreb Resin: A Facile Solid-Phase Route to Aldehyde and Ketone Derivatives of “Unnatural” Amino Acids and Peptides** *Journal of Combinatorial Chemistry* **2000**, *2*, 172.
- (141) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. **Staudinger Ligation: A Peptide from a Thioester and Azide** *Organic Letters* **2000**, *2*, 1939.
- (142) Dawson, P.; Muir, T.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. **Synthesis of proteins by native chemical ligation** *Science* **1994**, *266*, 776.
- (143) Link, A. J.; Mock, M. L.; Tirrell, D. A. **Non-canonical amino acids in protein engineering** *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, *14*, 603.
- (144) Connor, R. E.; Tirrell, D. A. **Non-Canonical Amino Acids in Protein Polymer Design** *Polymer Reviews* **2007**, *47*, 9.
- (145) Blackwell, H. E.; Grubbs, R. H. **Highly Efficient Synthesis of Covalently Cross-Linked Peptide Helices by Ring-Closing Metathesis** *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 3281.
- (146) Kodama, K.; Fukuzawa, S.; Nakayama, H.; Sakamoto, K.; Kigawa, T.; Yabuki, T.; Matsuda, N.; Shirouzu, M.; Takio, K.; Yokoyama, S.; Tachibana, K. **Site-Specific Functionalization of Proteins by Organopalladium Reactions** *ChemBioChem* **2007**, *8*, 232.
- (147) Ojida, A.; Tsutsumi, H.; Kasagi, N.; Hamachi, I. **Suzuki coupling for protein modification** *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 3301.
- (148) Deiters, A.; Cropp, T. A.; Mukherji, M.; Chin, J. W.; Anderson, J. C.; Schultz, P. G. **Adding Amino Acids with Novel Reactivity to the Genetic Code of *Saccharomyces Cerevisiae*** *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 11782.
- (149) Duckworth, B. P.; Xu, J.; Taton, T. A.; Guo, A.; Distefano, M. D. **Site-Specific, Covalent Attachment of Proteins to a Solid Surface** *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, 967.
- (150) Duckworth, B. P.; Zhang, Z.; Hosokawa, A.; Distefano, M. D. **Selective Labeling of Proteins by Using Protein Farnesyltransferase** *ChemBioChem* **2007**, *8*, 98.
- (151) Veronese, F. M. **Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions** *Biomaterials* **2001**, *22*, 405.

- (152) Fee, C. J.; Van Alstine, J. M. **PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues** *Chemical Engineering Science* **2006**, *61*, 924.
- (153) Broyer, R. M.; Quaker, G. M.; Maynard, H. D. **Designed Amino Acid ATRP Initiators for the Synthesis of Biohybrid Materials** *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 1041.
- (154) Rettig, H.; Krause, E.; Börner, H. G. **Atom Transfer Radical Polymerization with Polypeptide Initiators: A General Approach to Block Copolymers of Sequence-Defined Polypeptides and Synthetic Polymers** *Macromolecular Rapid Communications* **2004**, *25*, 1251.
- (155) Lele, B. S.; Murata, H.; Matyjaszewski, K.; Russell, A. J. **Synthesis of Uniform Protein-Polymer Conjugates** *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 3380.
- (156) Gravert, D. J.; Janda, K. D. **Organic Synthesis on Soluble Polymer Supports: Liquid-Phase Methodologies** *Chemical Reviews* **1997**, *97*, 489.
- (157) Hellermann, H.; Lucas, H.-W.; Maul, J.; Pillai, V. N. R.; Mutter, M. **Poly(ethylene glycol)s grafted onto crosslinked polystyrenes, 2. Multidetachably anchored polymer systems for the synthesis of solubilized peptides** *Die Makromolekulare Chemie* **1983**, *184*, 2603.
- (158) Bayer, E. **Towards the Chemical Synthesis of Proteins** *Angewandte Chemie International Edition in English* **1991**, *30*, 113.
- (159) Rapp, W. In *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*; Wiley-VCH Verlag GmbH: 2007, p 425.
- (160) Hartmann, L.; Börner, H. G. **Precision Polymers: Monodisperse, Monomer-Sequence-Defined Segments to Target Future Demands of Polymers in Medicine** *Advanced Materials* **2009**, *21*, 3425.
- (161) Hirsch, A. K. H.; Lauw, S.; Gersbach, P.; Schweizer, W. B.; Rohdich, F.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Diederich, F. **Nonphosphate Inhibitors of IspE Protein, a Kinase in the Non-Mevalonate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis and a Potential Target for Antimalarial Therapy** *ChemMedChem* **2007**, *2*, 806.
- (162) Hirsch, A. K. H.; Diederich, F.; Antonietti, M.; Börner, H. G. **Bioconjugates to specifically render inhibitors water-soluble** *Soft Matter* **2010**, *6*, 88.
- (163) Wang, T.; Mitchell, J.; Börner, H.; Colfen, H.; Antonietti, M. **BaCO₃ mesocrystals: new morphologies using peptide-polymer conjugates as crystallization modifiers** *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12*, 11984.
- (164) Ma, Y.; Börner, H. G.; Hartmann, J.; Cölfen, H. **Synthesis of dl-Alanine Hollow Tubes and Core-Shell Mesostructures** *Chemistry – A European Journal* **2006**, *12*, 7882.
- (165) Kühnle, R. I.; Börner, H. G. **Calciumionen als Schalter zur reversiblen Steuerung der Sekundär- und Quartärstrukturen in Biokonjugaten** *Angewandte Chemie* **2011**, *123*, 4592.
- (166) Schwemmer, T.; Baumgartner, J.; Faivre, D.; Börner, H. G. **Peptide-Mediated Nanoengineering of Inorganic Particle Surfaces: A General Route toward Surface Functionalization via Peptide Adhesion Domains** *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *134*, 2385.
- (167) Wilke, P.; Helfricht, N.; Mark, A.; Papastavrou, G.; Faivre, D.; Börner, H. G. **A Direct Biocombinatorial Strategy toward Next Generation, Mussel-Glue Inspired Saltwater Adhesives** *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 12667.

- (168) Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. **Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review** *Journal of Controlled Release* **2000**, *65*, 271.
- (169) Matsumura, Y.; Maeda, H. **A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs** *Cancer Research* **1986**, *46*, 6387.
- (170) Sledge Jr, G. W.; Miller, K. D. **Exploiting the hallmarks of cancer: the future conquest of breast cancer** *European Journal of Cancer* **2003**, *39*, 1668.
- (171) Teicher, B. A. **Molecular targets and cancer therapeutics: discovery, development and clinical validation** *Drug Resistance Updates* **2000**, *3*, 67.
- (172) Yuan, F. **Transvascular drug delivery in solid tumors** *Seminars in Radiation Oncology* **1998**, *8*, 164.
- (173) Petros, R. A.; DeSimone, J. M. **Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications** *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 615.
- (174) Dvorak, H. F.; Brown, L. F.; Detmar, M.; Dvorak, A. M. **Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis** *The American Journal of Pathology* **1995**, *146*, 1029.
- (175) Gerlowski, L. E.; Jain, R. K. **Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues** *Microvascular Research* **1986**, *31*, 288.
- (176) Hobbs, S. K.; Monsky, W. L.; Yuan, F.; Roberts, W. G.; Griffith, L.; Torchilin, V. P.; Jain, R. K. **Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 4607.
- (177) Yuan, F.; Dellian, M.; Fukumura, D.; Leunig, M.; Berk, D. A.; Torchilin, V. P.; Jain, R. K. **Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence and Cutoff Size** *Cancer Research* **1995**, *55*, 3752.
- (178) Fukumura, D.; Yuan, F.; Monsky, W. L.; Chen, Y.; Jain, R. K. **Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma** *The American Journal of Pathology* **1997**, *151*, 679.
- (179) Yuan, F.; Chen, Y.; Dellian, M.; Safabakhsh, N.; Ferrara, N.; Jain, R. K. **Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 14765.
- (180) Maeda, H. **Tumor-Selective Delivery of Macromolecular Drugs via the EPR Effect: Background and Future Prospects** *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21*, 797.
- (181) Seymour, L. W.; Duncan, R.; Strohalm, J.; Kopeček, J. **Effect of molecular weight (Mw) of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers on body distribution and rate of excretion after subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration to rats** *Journal of Biomedical Materials Research* **1987**, *21*, 1341.
- (182) Noguchi, Y.; Wu, J.; Duncan, R.; Strohalm, J.; Ulbrich, K.; Akaike, T.; Maeda, H. **Early Phase Tumor Accumulation of Macromolecules: A Great Difference in Clearance Rate between Tumor and Normal Tissues** *Japanese Journal of Cancer Research* **1998**, *89*, 307.
- (183) Kopeček, J.; Kopečková, P. In *Drug Delivery in Oncology*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2011, p 483.

- (184) Řihová, B.; Kopeček, J. **Biological properties of targetable poly[N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide]-antibody conjugates** *Journal of Controlled Release* **1985**, 2, 289.
- (185) Duncan, R.; Kopeček, J.; Rejmanová, P.; Lloyd, J. B. **Targeting of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers to liver by incorporation of galactose residues** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1983**, 755, 518.
- (186) Rejmanová, P.; Kopeček, J.; Pohl, J.; Baudyš, M.; Kostka, V. **Polymers containing enzymatically degradable bonds, 8. Degradation of oligopeptide sequences in N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers by bovine spleen cathepsin B** *Die Makromolekulare Chemie* **1983**, 184, 2009.
- (187) Šubr, V.; Kopeček, J.; Pohl, J.; Baudyš, M.; Kostka, V. **Cleavage of oligopeptide side-chains in N-(2-hydroxypropyl)meth-acrylamide copolymers by mixtures of lysosomal enzymes** *Journal of Controlled Release* **1988**, 8, 133.
- (188) Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K. **Photodynamic therapy for cancer** *Nat Rev Cancer* **2003**, 3, 380.
- (189) Bae, B.-c.; Yang, S.-G.; Jeong, S.; Lee, D. H.; Na, K.; Kim, J. M.; Costamagna, G.; Kozarek, R. A.; Isayama, H.; Deviere, J.; Seo, D. W.; Reddy, D. N. **Polymeric photosensitizer-embedded self-expanding metal stent for repeatable endoscopic photodynamic therapy of cholangiocarcinoma** *Biomaterials* **2014**, 35, 8487.
- (190) Silva, J. N.; Filipe, P.; Morlière, P.; Mazière, J.-C.; Freitas, J. P.; Gomes, M. M.; Santus, R. **Photodynamic therapy: Dermatology and ophthalmology as main fields of current applications in clinic** *Bio-Medical Materials and Engineering* **2008**, 18, 319.
- (191) Reiter, I.; Krammer, B.; Schwamberger, G. **Cutting Edge: Differential Effect of Apoptotic Versus Necrotic Tumor Cells on Macrophage Antitumor Activities** *The Journal of Immunology* **1999**, 163, 1730.
- (192) Buytaert, E.; Dewaele, M.; Agostinis, P. **Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2007**, 1776, 86.
- (193) Mroz, P.; Yaroslavsky, A.; Kharkwal, G. B.; Hamblin, M. R. **Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer** *Cancers* **2011**, 3, 2516.
- (194) O'Connor, A. E.; Gallagher, W. M.; Byrne, A. T. **Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy** *Photochemistry and Photobiology* **2009**, 85, 1053.
- (195) Krinick, N. L.; Sun, Y.; Joyner, D.; Spikes, J. D.; Straight, R. C.; Kopeček, J. **A polymeric drug delivery system for the simultaneous delivery of drugs activatable by enzymes and/or light** *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1994**, 5, 303.
- (196) Shiah, J. G.; Sun, Y.; Kopečková, P.; Peterson, C. M.; Straight, R. C.; Kopeček, J. **Combination chemotherapy and photodynamic therapy of targetable N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer–doxorubicin/mesochlorin e6-OV-TL 16 antibody immunoconjugates** *Journal of Controlled Release* **2001**, 74, 249.
- (197) Wilson, B. **Photodynamic therapy for cancer: Principles** *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology* **2002**, 16, 393.
- (198) Zhu, T. C.; Finlay, J. C. **The role of photodynamic therapy (PDT) physics** *Medical Physics* **2008**, 35, 3127.

- (199) Foote, C. S. **Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems** *Science (New York, N.Y.)* **1968**, 162, 963.
- (200) Robertson, C. A.; Evans, D. H.; Abrahamse, H. **Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2009**, 96, 1.
- (201) Laustriat, G. **Molecular mechanisms of photosensitization** *Biochimie* **1986**, 68, 771.
- (202) v. Tappeiner, H. **Die photodynamische Erscheinung (Sensibilisierung durch fluoreszierende Stoffe)** *Ergebnisse der Physiologie* **1909**, 8, 698.
- (203) von Tappeiner, H.; Jesionek, A. **Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen** *Münchener Med Wochenschr* **1903**, 50, 2042.
- (204) Ethirajan, M.; Chen, Y.; Joshi, P.; Pandey, R. K. **The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy** *Chemical Society Reviews* **2011**, 40, 340.
- (205) Berenbaum, M. C.; Akande, S. L.; Bonnett, R.; Kaur, H.; Ioannou, S.; White, R. D.; Winfield, U. J. **meso-Tetra(hydroxyphenyl)porphyrins, a new class of potent tumour photosensitisers with favourable selectivity** *British Journal of Cancer* **1986**, 54, 717.
- (206) Qian, P.; Evensen, J. F.; Rimington, C.; Moan, J. **A comparison of different photosensitizing dyes with respect to uptake C3H-tumors and tissues of mice** *Cancer Letters* **1987**, 36, 1.
- (207) Veenhuizen, R. B.; Ruevekamp, M. C.; Oppelaar, H.; Ransdorp, B.; van de Vijver, M.; Helmerhorst, T. J. M.; Kenemans, P.; Stewart, F. A. **Intraperitoneal Photodynamic Therapy: Comparison of Red and Green Light Distribution and Toxicity** *Photochemistry and Photobiology* **1997**, 66, 389.
- (208) Cai, H.; Wang, Q.; Luo, J.; Lim, C. K. **In vitro and in vivo metabolism of 5,10,15,20-tetra (m-hydroxyphenyl)chlorin in rats and humans** *Biomedical Chromatography* **1999**, 13, 184.
- (209) Whelpton, R.; Michael-Titus, A. T.; Jamdar, R. P.; Abdillahi, K.; Grahn, M. F. **Distribution and Excretion of Radiolabeled Temoporfin in a Murine Tumor Model** *Photochemistry and Photobiology* **1996**, 63, 885.
- (210) Triesscheijn, M.; Ruevekamp, M.; Out, R.; Van Berkel, T. C.; Schellens, J.; Baas, P.; Stewart, F. **The pharmacokinetic behavior of the photosensitizer meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin in mice and men** *Cancer Chemother Pharmacol* **2007**, 60, 113.
- (211) Kessel, D.; Sykes, E. 1999; Vol. 3592, p 37.
- (212) Pegaz, B.; Debefve, E.; Ballini, J. P.; Wagnières, G.; Spaniol, S.; Albrecht, V.; Scheglmann, D. V.; Nifantiev, N. E.; van den Bergh, H.; Konan-Kouakou, Y. N. **Photothrombic activity of m-THPC-loaded liposomal formulations: Pre-clinical assessment on chick chorioallantoic membrane model** *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006**, 28, 134.
- (213) Kachatkou, D.; Sasnouski, S.; Zorin, V.; Zorina, T.; D'Hallewin, M.-A.; Guillemin, F.; Bezdetnaya, L. **Unusual Photoinduced Response of mTHPC Liposomal Formulation (Foslip)** *Photochemistry and Photobiology* **2009**, 85, 719.
- (214) Xie, H.; Svenmarker, P.; Axelsson, J.; Gräfe, S.; Kyriazi, M.; Bendsoe, N.; Andersson-Engels, S.; Svanberg, K. **Pharmacokinetic and biodistribution study following**

- systemic administration of Fospeg® – a Pegylated liposomal mTHPC formulation in a murine model** *Journal of Biophotonics* **2015**, 8, 142.
- (215) Reshetov, V.; Lassalle, H.-P.; François, A.; Dumas, D.; Hupont, S.; Gräfe, S.; Filipe, V.; Jiskoot, W.; Guillemin, F.; Zorin, V.; Bezdetnaya, L. **Photodynamic therapy with conventional and PEGylated liposomal formulations of mTHPC (temoporfin): comparison of treatment efficacy and distribution characteristics in vivo** *International Journal of Nanomedicine* **2013**, 8, 3817.
- (216) de Visscher, S. A. H. J.; Kaščáková, S.; de Bruijn, H. S.; van den Heuvel, A. v. d. P.; Amelink, A.; Sterenborg, H. J. C. M.; Robinson, D. J.; Roodenburg, J. L. N.; Witjes, M. J. H. **Fluorescence localization and kinetics of mTHPC and liposomal formulations of mTHPC in the window-chamber tumor model** *Lasers in Surgery and Medicine* **2011**, 43, 528.
- (217) Smith, G. **Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface** *Science* **1985**, 228, 1315.
- (218) Á Furka, S. F., M. Asgedom, G. Dibó **General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures** *International Journal of Peptide and Protein Research* **1991**, 37, 487.
- (219) Furka, Á.; Sebestyén, F.; Asgedom, M.; Dibó, G. **General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures** *International Journal of Peptide and Protein Research* **1991**, 37, 487.
- (220) Cote, S. New polyether based monomers and highly cross-linked amphiphile resins. WO 2005012277 A1, 10. Febr. 2005.
- (221) Cote, S. Amphiphile solid support for peptide synthesis, bioorganic and organic chemistry. WO2002040559 A3, Dec 27, 2002.
- (222) Gross, E.; Witkop, B. **Nonenzymatic Cleavage of Peptide Bonds: The Methionine Residues in Bovine Pancreatic Ribonuclease** *Journal of Biological Chemistry* **1962**, 237, 1856.
- (223) Juskowiak, G. L.; McGee, C. J.; Greaves, J.; Van Vranken, D. L. **Synthesis, Screening, and Sequencing of Cysteine-Rich One-Bead One-Compound Peptide Libraries** *Journal of Combinatorial Chemistry* **2008**, 10, 726.
- (224) Bonnett, R.; Djelal, B. D.; Nguyen, A. **Physical and chemical studies related to the development of m-THPC (FOSCAN®) for the photodynamic therapy (PDT) of tumours** *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2001**, 5, 652.
- (225) Kaščáková, S.; Kruijt, B.; de Bruijn, H. S.; van der Ploeg-van den Heuvel, A.; Robinson, D. J.; Sterenborg, H. J. C. M.; Amelink, A. **Ex vivo quantification of mTHPC concentration in tissue: Influence of chemical extraction on the optical properties** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2008**, 91, 99.
- (226) Sadowski, J.; Gasteiger, J.; Klebe, G. **Comparison of Automatic Three-Dimensional Model Builders Using 639 X-ray Structures** *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1994**, 34, 1000.
- (227) Gerber, P.; Müller, K. **MAB, a generally applicable molecular force field for structure modelling in medicinal chemistry** *J. Computer-Aided Mol. Des.* **1995**, 9, 251.
- (228) Jarvi, Mark T.; Patterson, Michael S.; Wilson, Brian C. **Insights into Photodynamic Therapy Dosimetry: Simultaneous Singlet Oxygen Luminescence and Photosensitizer Photobleaching Measurements** *Biophysical Journal* **2012**, 102, 661.

- (229) Ferreira, J.; Menezes, P. F. C.; Kurachi, C.; Sibata, C.; Allison, R. R.; Bagnato, V. S. **Photostability of different chlorine photosensitizers** *Laser Physics Letters* **2008**, *5*, 156.
- (230) Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M. **The History of Photodetection and Photodynamic Therapy** *Photochemistry and Photobiology* **2001**, *74*, 656.
- (231) McIlroy, B. W.; Mann, T. S.; Dysart, J. S.; Wilson, B. C. **The effects of oxygenation and photosensitizer substrate binding on the use of fluorescence photobleaching as a dose metric for photodynamic therapy** *Vibrational Spectroscopy* **2002**, *28*, 25.
- (232) Michael-Titus, A. T.; Whelpton, R.; Yaqub, Z. **Binding of temoporfin to the lipoprotein fractions of human serum** *British Journal of Clinical Pharmacology* **1995**, *40*, 594.
- (233) An, W.; Jiao, Y.; Dong, C.; Yang, C.; Inoue, Y.; Shuang, S. **Spectroscopic and molecular modeling of the binding of meso-tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrin to human serum albumin** *Dyes and Pigments* **2009**, *81*, 1.
- (234) Hopper, C.; Kübler, A.; Lewis, H.; Tan, I. B.; Putnam, G.; the Foscan 01 Study, G. **mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma** *International Journal of Cancer* **2004**, *111*, 138.
- (235) Siegel, R.; Rathbone, M. In *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*; Siepmann, J., Siegel, R. A., Rathbone, M. J., Eds.; Springer US: 2012, p 19.
- (236) Loew, S.; Fahr, A.; May, S. **Modeling the Release Kinetics of Poorly Water-Soluble Drug Molecules from Liposomal Nanocarriers** *Journal of Drug Delivery* **2011**, *2011*, 10.
- (237) Hackbarth, S.; Schlothauer, J.; Preuss, A.; Röder, B. **Highly sensitive time resolved singlet oxygen luminescence detection using LEDs as the excitation source** *Laser Physics Letters* **2013**, *10*, 125702.
- (238) Tjernberg, A.; Markova, N.; Griffiths, W. J.; Hallén, D. **DMSO-Related Effects in Protein Characterization** *Journal of Biomolecular Screening* **2006**, *11*, 131.
- (239) Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F. **Wechselwirkungen mit aromatischen Ringen in chemischen und biologischen Erkennungsprozessen** *Angewandte Chemie* **2003**, *115*, 1244.
- (240) Schwaar, T. Bachelor Thesis, Humboldt-Universität zu Berlin, 2012.
- (241) Wieczorek, S.; Schwaar, T.; Senge, M. O.; Börner, H. G. **Specific Drug Formulation Additives: Revealing the Impact of Architecture and Block Length Ratio** *Biomacromolecules* **2015**, *16* (10), 3308 – 3312.
- (242) Velluto, D.; Demurtas, D.; Hubbell, J. A. **PEG-b-PPS Diblock Copolymer Aggregates for Hydrophobic Drug Solubilization and Release: Cyclosporin A as an Example** *Molecular Pharmaceutics* **2008**, *5*, 632.
- (243) Gonçalves da Silva, A. M.; Filipe, E. J. M.; d'Oliveira, J. M. R.; Martinho, J. M. G. **Interfacial Behavior of Poly(styrene)–Poly(ethylene oxide) Diblock Copolymer Monolayers at the Air–Water Interface. Hydrophilic Block Chain Length and Temperature Influence** *Langmuir* **1996**, *12*, 6547.
- (244) Antonietti, M.; Förster, S.; Oestreich, S. **Micellization of amphiphilic block copolymers and use of their micelles as nanosized reaction vessels** *Macromolecular Symposia* **1997**, *121*, 75.
- (245) Nagarajan, R. In *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization*; American Chemical Society: 2008; Vol. 996, p 341.

- (246) Vigne, S. Master Thesis, Humboldt-Universität zu Berlin, 2012.
- (247) Wieczorek, S.; Vigne, S.; Masini, T.; Ponader, D.; Hartmann, L.; Hirsch, A. K. H.; Börner, H. G. **Combinatorial Screening for Specific Drug Solubilizers with Switchable Release Profiles** *Macromolecular Bioscience* **2015**, *15*, 82.
- (248) Hartmann, L.; Häfele, S.; Peschka-Süss, R.; Antonietti, M.; Börner, H. G. **Sequence Positioning of Disulfide Linkages to Program the Degradation of Monodisperse Poly(amidoamines)** *Macromolecules* **2007**, *40*, 7771.
- (249) Jones, D. P.; Carlson, J. L.; Mody Jr, V. C.; Cai, J.; Lynn, M. J.; Sternberg Jr, P. **Redox state of glutathione in human plasma** *Free Radical Biology and Medicine* **2000**, *28*, 625.
- (250) Kakizawa, Y.; Harada, A.; Kataoka, K. **Environment-Sensitive Stabilization of Core-Shell Structured Polyion Complex Micelle by Reversible Cross-Linking of the Core through Disulfide Bond** *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 11247.
- (251) Oupický, D.; Parker, A. L.; Seymour, L. W. **Laterally Stabilized Complexes of DNA with Linear Reducible Polycations: Strategy for Triggered Intracellular Activation of DNA Delivery Vectors** *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *124*, 8.
- (252) Lee, Y.; Koo, H.; Jin, G.-w.; Mo, H.; Cho, M. Y.; Park, J.-Y.; Choi, J. S.; Park, J. S. **Poly(ethylene oxide sulfide): New Poly(ethylene glycol) Derivatives Degradable in Reductive Conditions** *Biomacromolecules* **2004**, *6*, 24.
- (253) Rosenkranz, A. A.; Jans, D. A.; Sobolev, A. S. **Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency** *Immunol. Cell Biol.* **2000**, *78*, 452.
- (254) Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. **Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization** *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2004**, *1*, 279.
- (255) Hudson, R.; Boyle, R. W. **Strategies for selective delivery of photodynamic sensitizers to biological targets** *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2004**, *08*, 954.
- (256) Melnikova, V. O.; Bezdetnaya, L. N.; Bour, C.; Festor, E.; Gramain, M. P.; Merlin, J. L.; Potapenko, A. Y.; Guillemin, F. **Subcellular localization of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in human tumor cells subjected to photodynamic treatment** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1999**, *49*, 96.
- (257) Schneider, U.; Schwenk, H.-U.; Bornkamm, G. **Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma** *International Journal of Cancer* **1977**, *19*, 621.
- (258) Compagnin, C.; Moret, F.; Celotti, L.; Miotto, G.; Woodhams, J. H.; MacRobert, A. J.; Scheglmann, D.; Iratni, S.; Reddi, E. **Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-loaded liposomes sterically stabilised with poly(ethylene glycol) of different length and density: characterisation, in vitro cellular uptake and phototoxicity** *Photochemical & Photobiological Sciences* **2011**, *10*, 1751.
- (259) Buchholz, J.; Kaser-Hotz, B.; Khan, T.; Rohrer Bley, C.; Melzer, K.; Schwendener, R. A.; Roos, M.; Walt, H. **Optimizing Photodynamic Therapy: In vivo Pharmacokinetics of Liposomal meta-(Tetrahydroxyphenyl)Chlorin in Feline Squamous Cell Carcinoma** *Clinical Cancer Research* **2005**, *11*, 7538.

- (260) Rezzoug, H.; Bezdetnaya, L.; A'Amar, O.; Merlin, J. L.; Guillemin, F. **Parameters Affecting Photodynamic Activity of Foscan® or Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) In Vitro and In Vivo** *Lasers Med. Sci.* **1998**, *13*, 119.
- (261) Lee, S. S.; Lim, J.; Cha, J.; Tan, S.; Heath, J. R. **Rapid Microwave-Assisted CNBr Cleavage of Bead-Bound Peptides** *Journal of Combinatorial Chemistry* **2008**, *10*, 807.
- (262) Lassalle, V.; Ferreira, M. L. **PLA Nano- and Microparticles for Drug Delivery: An Overview of the Methods of Preparation** *Macromolecular Bioscience* **2007**, *7*, 767.
- (263) Hoogenboom, R. **Poly(2-oxazoline)s: A Polymer Class with Numerous Potential Applications** *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 7978.
- (264) Mosmann, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays** *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55.
- (265) Matsumoto, Y.; Nomoto, T.; Cabral, H.; Matsumoto, Y.; Watanabe, S.; Christie, R. J.; Miyata, K.; Oba, M.; Ogura, T.; Yamasaki, Y.; Nishiyama, N.; Yamasoba, T.; Kataoka, K. **Direct and instantaneous observation of intravenously injected substances using intravital confocal micro-videography** *Biomedical Optics Express* **2010**, *1*, 1209.
- (266) Nomoto, T.; Matsumoto, Y.; Miyata, K.; Oba, M.; Fukushima, S.; Nishiyama, N.; Yamasoba, T.; Kataoka, K. **In situ quantitative monitoring of polyplexes and polyplex micelles in the blood circulation using intravital real-time confocal laser scanning microscopy** *Journal of Controlled Release* **2011**, *151*, 104.
- (267) Wieczorek, S.; Krause, E.; Hackbarth, S.; Röder, B.; Hirsch, A. K. H.; Börner, H. G. **Exploiting Specific Interactions toward Next-Generation Polymeric Drug Transporters** *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 1711.
- (268) Ponader, D.; Wojcik, F.; Beceren-Braun, F.; Dervede, J.; Hartmann, L. **Sequence-Defined Glycopolymer Segments Presenting Mannose: Synthesis and Lectin Binding Affinity** *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1845.
- (269) Zmatliková, Z.; Sedláková, P.; Lacinová, K.; Eckhardt, A.; Pataridis, S.; Mikšik, I. **Non-enzymatic posttranslational modifications of bovine serum albumin by oxo-compounds investigated by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry and capillary zone electrophoresis–mass spectrometry** *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 8009.
- (270) Schnablegger, H.; Glatter, O. **Optical sizing of small colloidal particles: an optimized regularization technique** *Appl. Opt.* **1991**, *30*, 4889.
- (271) Schlothauer, J.; Hackbarth, S.; Röder, B. **A new benchmark for time-resolved detection of singlet oxygen luminescence – revealing the evolution of lifetime in living cells with low dose illumination** *Laser Physics Letters* **2009**, *6*, 216.
- (272) Jiménez-Banzo, A.; Sagristà, M. L.; Mora, M.; Nonell, S. **Kinetics of singlet oxygen photosensitization in human skin fibroblasts** *Free Radical Biology and Medicine* **2008**, *44*, 1926.
- (273) Jarvi, M. T.; Niedre, M. J.; Patterson, M. S.; Wilson, B. C. **The Influence of Oxygen Depletion and Photosensitizer Triplet-state Dynamics During Photodynamic Therapy on Accurate Singlet Oxygen Luminescence Monitoring and Analysis of Treatment Dose Response** *Photochemistry and Photobiology* **2011**, *87*, 223.

- (274) Snyder, J. W.; Skovsen, E.; Lambert, J. D. C.; Ogilby, P. R. **Subcellular, Time-Resolved Studies of Singlet Oxygen in Single Cells** *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 14558.
- (275) Hackbarth, S.; Schlothauer, J.; Preuß, A.; Ludwig, C.; Röder, B. **Time resolved sub-cellular singlet oxygen detection – ensemble measurements versus single cell experiments** *Laser Physics Letters* **2012**, *9*, 474.

9. Abkürzungsverzeichnis

Es wurde der Ein- und Drei-Buchstaben-Code für Aminosäuren, empfohlen von der IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), benutzt (*Eur. J. Biochem.*, 1984, 138, 9-37).

Ahx	6-Aminohexylsäure
AMD	Altersabhängige Makulardegeneration
ATRP	Atom-Transfer-Radikal-Polymerisation
BSA	Bovines Serum Albumin
Ce6	Chlorin E6
cLogP	Berechneter Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (engl.: <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>)
CSD	Camebridge Structural Database
DCM	Dichlormethan
DDS	<i>Drug-Delivery-Systeme</i>
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DOX	Doxorubicin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	<i>DL</i> -Dithiothreitol
EDT	1,2-Ethandithiol
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (engl.: <i>European Medicines Agency</i>)
EO	Ethylenoxid
EPR	engl.: <i>Enhanced Permeability and Retention</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenzaktivierte-Zellsortierung (engl. <i>Fluorescence activated cell sorting</i>)
FBS	Fetales Kälberserum

FDA	US-amerikanischen Behörde für Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassung (engl.: <i>Food and Drug Administration</i>)
FLIM	Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie
FRET	Förster-Resonanz Energietransfer
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
FWHM	Halbwertsbreite (engl.: <i>Full Width at Half Maximum</i>)
GPCRs	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (engl.: <i>G-Proteine-Coupled Receptors</i>)
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HdP	Haematoporphyrin-Derivate
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie
HPMA	Polyhydroxypropylmethacrylamid
HsL	Homoserin-Lacton
HTS	Hochdurchsatz-Screening (engl.: <i>High Throughput Screening</i>)
IC	Innere Umwandlung (engl.: <i>Internal Conversion</i>)
IC₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
ISC	Interkombination (engl.: <i>Inter System Crossing</i>)
IVRTCLSM	Intravitale Echtzeitkonfokal-Laser-Scanning-Mikroskopie (Engl.: <i>Intravital Real-time Confocal Laser Scanning Microscopy</i>)
(L)ADME	engl.: (<i>Liberation,</i>) <i>Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion</i>
LC	Flüssigchromatographie (engl. <i>Liquid chromatography</i>)
L-DOPA	<i>L</i> -3,4-Dihydroxyphenylalanin
LED	Licht-emittierende Diode
logP	Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (engl.: <i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
MDR	Multiple Wirkstoffresistenz (engl.: <i>Multiple drug resistance</i>)
MTD	Maximal tolerierte Dosis
<i>m</i>-THPC	5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)chlorin
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWCO	Molekulargewichts-Ausschlussgrenze (engl. <i>Molecular weight cut-off</i>)
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis

NCL	Native chemische Ligation
Nd:YLF	Neodym-dotierte Yttrium-Lithium-Fluorid
NME	engl.: <i>New Molecular Entity</i>
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz (engl.: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
OBOC	engl.: <i>One-Bead-One-Compound</i>
Pal	Palmitinsäure
PAP	engl.: <i>PEG attached peptide</i>
Pba	Pheophorbid A
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>Polymerase chain reaction</i>)
PDI	Polydispersitätsindex
PD	Photodiagnostik
PDT	Photodynamische Therapie
PEO	Polyethylenoxid
PEG	Polyethylenglycol
PGA	Polyglycolide
PLA	Polylactid
PLGA	Polylactid-co-Glycolide
POx	Poly(2-oxazolin)
PPO	Polypropylenoxid
PS	Photosensibilisator
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxyltripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
RES	Retikuloendotheliales System
R_h	Hydrodynamischer Radius
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>Rounds per minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SG	Schutzgruppe
SPS	Festphasensynthese (engl.: <i>Solid Phase Synthesis</i>)
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (engl.: <i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>)

TCEP	<i>Tris</i> (2-Carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure (engl. <i>Trifluoroacetic acid</i>)
ToF	Flugzeit (engl.: <i>Time-of-flight</i>)
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UV/Vis	Ultraviolettes und sichtbares (engl.: <i>visible</i>) Licht

10. Danksagung

Ich danke ganz besonders Herrn Prof. Dr. Hans G. Börner für das entgegengebrachte Vertrauen und seine Unterstützung während meiner Promotion. Ich danke ihm für die ausführlichen fachlichen Diskussionen und wichtigen Impulse zur erfolgreichen Umsetzung und Entwicklung dieses interessanten Projektes, sowie für die Möglichkeit, meine Forschungsergebnisse auf nationalen und internationalen Konferenzen präsentieren zu können. Außerdem möchte ich Prof. Dr. Christian Hackenberger und Prof. Dr. Tanja Weil für die Begutachtung meiner Arbeit danken.

Für die schnelle Durchsicht und Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit danke ich Christian Stutz, Patrick Wilke und Maria Meißler.

Der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Börner danke ich für die gut Zeit und hilfreiche Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt dabei meinen Kollegen Maria Meißler, Christian Stutz, Patrick Wilke, Thorsten Schwemmer, Matthias Röber, Felix Hanßke, Steffi Große, Dario Remmler, Carmen Lawatscheck, Katharina Linkert und Regina König, die für mich besonders zu einem tollen Arbeitsklima beigetragen haben. An dieser Stelle möchte ich mich zusätzlich auch ganz herzlich bei Katharina Linkert für ihre Hilfe bei der Synthese einiger Konjugate, sowie Felix Hanßke und Antje Völkel für DLS-Messungen und Dario Remmler, Justus Horsch und Patrick Wilke für die Messung von MALDI-ToF-MS-Spektren, bedanken. Regina König danke ich für ihr allzeit offenes Ohr und die Bewältigung diverser Papierkriege.

Bei Sara Vigne, Timm Schwaar, Matthias Röber und Jens Schöne, welche in ihren Bachelor-, Master- bzw. Diplomarbeiten wichtige Teilprojekte dieser Arbeit mitgestaltet haben, möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Ein großer Dank gilt Heike Stephanowitz und Dr. Eberhard Krause des Leibniz-Instituts für Molekulare Pharmakologie in Berlin-Buch, durch deren Hilfe und Expertise auf dem Gebiet der MS/MS-Sequenzierung und Proteomik Schlüsselfragen diese Arbeit überhaupt erst beantwortet werden konnten. Dr. Annegret Preuss, Dr. Steffen Hackbarth und Prof. Dr. Beate Röder vom Institut für Physik der Humboldt-Universität zu Berlin danke ich sehr für die produktive Zusammenarbeit bezüglich Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz und *in vitro* Zellversuche, sowie für hilfreiche Anregungen. Tiziana Masini und Prof. Dr. Anna K. H. Hirsch der Rijksuniversiteit Groningen (NL) danke ich für die durchgeführten *in silico* Bindungsstudien. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Oliver Seitz für die Möglichkeit zur Nutzung des Fluoreszenzmikroskops bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, welche mich die ganzen Jahre begleitet haben. Ganz besonders herzlicher Dank gilt dabei meiner Mutter, die mich in allen Phasen meines Werdegangs bedingungslos unterstützt hat und mir die Rückendeckung zuteilkommen ließ, die nötig war, um diesen Weg zu gehen. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.



Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Sebastian Wiczorek, die vorliegende Arbeit selbstständig erarbeitet und verfasst zu haben. Es wurden keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet.

Sebastian Wiczorek, Berlin den 23.11.2015